

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

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**ÉTUDE DES FACTEURS DE RISQUE, MÉTHODES DE
DIAGNOSTIC ET IMPACTS DES ENDOMETRITES SUR LES
PERFORMANCES DE LA REPRODUCTION CHEZ LA
VACHE LAITIÈRE EN ALGÉRIE**

Présentée par

Mounir Adnane

Soutenue le 19 Décembre 2017

Les membres du jury :

Khelef Djamel	Président	Professeur	ENSV Alger
Khatima Ait-Oudhia	Examineur	Professeur	ENSV Alger
Benallou bouabdellah	Examineur	Professeur	ISV Tiaret ISV
Lafri Mohamed	Examineur	Professeur	ISV Blida
Miroud Kamel	Examineur	MCA	Univ. Eltarf
Kaidi Rachid	Directeur de thèse	Professeur	ISV Blida
Christian Hanzen	Co-Directeur de thèse	Professeur	Univ. Liège, Belgique

Année universitaire 2017-2018

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

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**ÉTUDE DES FACTEURS DE RISQUE, MÉTHODES DE
DIAGNOSTIC ET IMPACTS DES ENDOMETRITES SUR LES
PERFORMANCES DE LA REPRODUCTION CHEZ LA
VACHE LAITIÈRE EN ALGÉRIE**

Présentée par

Mounir Adnane

Soutenue le 19 Décembre 2017

Les membres du jury :

Khelef Djamel	Président	Professeur	ENSV Alger
Khatima Ait-Oudhia	Examineur	Professeur	ENSV Alger
Benallou bouabdellah	Examineur	Professeur	ISV TiaretISV
Lafri Mohamed	Examineur	Professeur	ISV Blida
Miroud Kamel	Examineur	MCA	Univ. Eltarf
Kaidi Rachid	Directeur de thèse	Professeur	ISV Blida
Christian Hanzen	Co-Directeur de thèse	Professeur	Univ. Liège, Belgique

Année universitaire 2017-2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

بسم الله الذي لا يُبدأ بغير اسمه، ولا يُسبق في الحمد والشكر. فالحمد لله الذي بحمده
تم الصالحات والحمد لله على نعمائه، وأجلها نعمة الإسلام. اللهم علمنا ما ينفعنا وانفعنا
بما علمتنا

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance et ma gratitude au directeur de cette thèse Pr Kaidi Rachid pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Mes remerciements vont également à Prof. Hanzen Christian, qui a Co-encadré et enrichi ce travail. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Je tiens à remercier Prof. O'Farrelly Cliona qui m'a accueillie dans son laboratoire durant toute une année. Merci pour votre vision, vos conseils et votre soutien moral. Je vous adresse mon profond respect et gratitude.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Prof. Khelef Djamel pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Prof. Ait-Oudhia Khatima qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Mes remerciements vont également à Prof. Lafri Mohamed qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Mes remerciements vont également à Prof. Benallou bouabdellah qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Dr. Miroud Kamel qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers Dr. Kieran Meade et Dr. Aspinas Chapwanya pour leurs disponibilités, leurs conseils et orientations et pour leurs sens de partage. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

J'exprime ma reconnaissance pour Erin Williams, Marijke Beltman, Alex Evans, Steve Carrington et Wim Meijer pour les discussions utiles et esprit critique. Je tiens à remercier aussi Margaret Murray, Ronan Whiston, Amy Brewer et Megan O'Brien pour leurs aide technique et leurs conseils.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et l'Université de Tiaret qui ont financé mon séjour en Irlande pour la réalisation de la partie immunologique.

Je remercie les éleveurs qui ont permis l'accès à leurs vaches.

TESTIMONY

Experimental studies on immunology of reproduction were conducted under the main supervision of **Professor Cliona O'Farrelly**, from School of Biochemistry and Immunology, Trinity College Dublin, Ireland. Prof O'Farrelly is named officially as **Co-supervisor** for this PhD thesis by the scholarship given to me by the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research and the University of Tiaret.

Dr. Kieran Meade, Research Officer - Immunogenetics & Animal Health at the Agriculture and Food Development Authority -Teagasc –, Ireland, and **Dr. Aspinas Chapwanya**, Assistant Professor of Theriogenology at School of Veterinary Medicine, Ross University, St. Kitts were named officially by Prof. O'Farrelly as **co-supervisors** and they contributed equally to this PhD thesis.

Dédicaces

*A mes très chers parents, qui ont toujours
été là pour moi, « Vous avez tout sacrifié
pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts.
Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur
et de persévérance. Je suis redevable d'une
éducation dont je suis fier ».*

*À ma femme pour son soutien moral et à ma
petite princesse SOFIA, que dieu te garde pour moi.*

*À mes frères et mes sœurs, que dieu
vous bénisse.*

Mounir Adnane

Résumé

L'endométrite influe de manière significative la fertilité et la production laitière, ce qui réduit la rentabilité de l'élevage laitier. Chez les bovins qui développent une endométrite, il y a un dérèglement de la réaction inflammatoire physiologique, nécessaire à l'élimination de toute éventuelle contamination bactérienne de l'utérus et pour assurer l'involution utérine. Dans cette étude nous avons étudié le taux des endométrites, entre 21-60 jours postpartum (JPP) chez 99 vaches laitières, avec la détermination des facteurs de risques et l'impact des endométrites sur les performances de la reproduction. Le taux d'endométrite cytologique, clinique et subclinique était 41.4%, 22.2% et 19.2%, respectivement. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés dont certains sont spécifiques à une forme clinique ou subclinique et d'autres sont communs. Nous avons trouvé que l'endométrite affecte gravement les performances de la reproduction notamment la forme subclinique.

Nous avons développé une nouvelle technique de diagnostic basée sur le dosage des biomarqueurs de l'inflammation dans le mucus cervico-vaginal (MVC). Tous les biomarqueurs inflammatoires, à l'exception du C5b, sont demeurés élevés chez les vaches souffrant d'endométrite clinique de 7 à 21 JPP, ce qui indique une inflammation endométriale persistante et chronique. Les taux d'IL1 β , IL-6, IL-8 et de Hp étaient plus élevés dans les MCV chez les vaches souffrant d'endométrite clinique par rapport aux vaches saines 21 JPP. Il était très intéressant de constater que les taux d'IL-1 β sont augmentés dans le MCV des vaches avec endométrite clinique mais pas chez les vaches saines 7 JPP, suggérant que le dosage précoce d'IL-1 β pourrait constituer un marqueur prédictif utile de l'endométrite clinique. Nos résultats montrent que le MCV est très pratique pour le dépistage des marqueurs de l'inflammation qui témoigne une inflammation persistante de l'utérus.

Mots clés : endométrite diagnostic, facteurs de risque, impact, mucus cervico-vaginal, immunologie.

Abstract

Endometritis significantly affects fertility and milk production, which reduces the profitability of dairy farming. Cows that develop endometritis have an important alteration of the physiological inflammation necessary to eliminate any bacterial contamination from the uterus and to ensure complete uterine involution. In the present work, we determined the amount of endometritis in 99 dairy cows, between 21-60 days postpartum (DPP) with the determination of risk factors and impacts of endometritis on reproductive performances. The amount of cytological, clinical and subclinical endometritis was 41.4%, 22.2% and 19.2%, respectively. Several risk factors were detected, some of them are specific to clinical or subclinical endometritis whereas some others are common for the two forms. We also found that endometritis, mainly the subclinical form disrupts the reproductive performances

We successfully developed a new diagnosis technique based on the measurement of inflammatory biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM). All inflammatory biomarkers, with the exception of C5b, remained elevated in cows with clinical endometritis 7-21 DPP, indicating persistent and chronic endometrial inflammation. IL-1 β , IL-6, IL-8 and Hp levels were higher in CVM of cows with clinical endometritis than in healthy cows. It was very interesting that IL-1 β levels were increased in CVM of cows with clinical endometritis but not in healthy cows 7 DPP, suggesting that early measurement of IL-1 β could be a useful predictive marker of clinical endometritis.

Keywords: endometritis diagnosis, risk factors, impact, cervicovaginal mucus, immunology.

ملخص

التهاب بطانة الرحم يؤثر بشكل كبير على الخصوبة وإنتاج الحليب، مما يقلل من ربحية تجارة الأبقار الحلوب. في الأبقار التي هي عرضة للإصابة بالتهاب بطانة الرحم هناك خلل في أنظمة ضبط ومراقبة الالتهابات الفسيولوجية للرحم والتي هي أساسية للقضاء على أي تلوث بكتيري وضمان عودة الرحم إلى الحالة الطبيعية. في هذه الدراسة درسنا انتشار التهاب بطانة الرحم في 99 بقرة حلوب بن 21 و60 يوما بعد الولادة مع دراسة العوامل المساعدة على حدوث المرض وتأثيرها على مؤشرات التكاثر. لقد اكتشفنا أن نسبة التهاب بطانة الرحم الخلوي، السريري وشبه السريري يقدر بنسبة 41.4% و22.2% و19.2% على التوالي. لقد وجدنا عدة عوامل خطر تساعد على حدوث نوع معين من التهاب الرحم أو مشترك بين النوعين. كان جليا أن التهاب الرحم يؤثر سلبا على مباشرات التكاثر خاصة في الحالة شبه السريرية.

لقد طورنا تقنية تشخيص جديدة تعتمد على قياس المؤشرات البيولوجية في مخاط الرحم والمهبل. انخفضت مستويات البروتين الكلي بشكل ملحوظ في الأبقار المصابة وذلك بين الفترة 7 و21 يوم بعد الولادة. ظلت جميع المؤشرات الحيوية الالتهابية، باستثناء C5b، مرتفعة في الأبقار المصابة بالتهاب بطانة الرحم السريري من 7 إلى 21 يوم بعد الولادة، مما يدل على أن التهاب بطانة الرحم يعتبر مرض مزمن ناتج عن استمرار الالتهاب الفيزيولوجي. كانت مستويات انترلوكين 1 و6 والهبتوغلوبين أعلى في الأبقار المصابة مقارنة بالأبقار المعافاة. من المثير جدا للاهتمام أن مستويات انترلوكين 1 β زادت حصريا عند الأبقار المصابة 7 أيام بعد الولادة مما يشير إلى أن الانترلوكين 1 β يمكن أن يكون علامة تنبؤية مفيدة للتشخيص المبكر لالتهاب بطانة الرحم السريري.

كلمات البحث: تشخيص التهاب بطانة الرحم، عوامل الخطر، التأثير، المخاط المهبل، المناعة.

Table des matières

REMERCIEMENTS	
DEDICACES.....	
RESUME.....	I
TABLE DES MATIERES.....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
TABLE DE FIGURES.....	XV
INTRODUCTION GENERALE.....	25
PREMIERE PARTIE.....	27
CHAPITRE 1 : ÉPIDÉMIOLOGIE DES ENDOMETRITES.....	28
1. DEFINITION :.....	28
2. ÉTIOPATHOGENIE :.....	29
3. DIAGNOSTIC :.....	30
3.1. <i>Palpation transrectale</i>	31
3.2. <i>Contenu vaginal</i>	32
3.3. <i>Échographie</i>	35
3.4. <i>Histologie</i>	37
3.5. <i>Cytologie</i>	44
3.6. <i>Bactériologie</i>	48
4. FACTEURS DE RISQUE DES ENDOMETRITES.....	51
4.1. <i>Facteurs extrinsèques</i>	51
4.2. <i>Facteurs intrinsèques</i>	53
5. IMPACTS DES ENDOMETRITES.....	66
CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE DES ENDOMETRITES.....	70
1. INTRODUCTION.....	70
2. COMPOSITION DU MUCUS.....	70
3. ROLE IMMUNOLOGIQUE DU MCV.....	71
4. ROLE PHYSIQUE -MECANIQUE DU MVC.....	72
5. TRAITEMENT ET ANALYSE DU MCV.....	73
6. INFLAMMATION PHYSIOLOGIQUE -SAINE- DE L'UTERUS.....	74

7. INFLAMMATION PATHOLOGIQUE -CHROMIQUE- DE L'UTERUS	82
DEUXIEME PARTIE.....	84
CHAPITRE 1 : COMPARAISON DE MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DES ENDOMETRITES	85
1. INTRODUCTION	85
2. MATERIEL ET METHODES.....	85
3. RESULTATS.....	92
4. DISCUSSION.....	98
5. CONCLUSION	105
CHAPITRE 2 : FACTEURS DE RISQUE DES ENDOMETRITES	107
1. INTRODUCTION	107
2. MATERIEL ET METHODES.....	107
3. RESULTATS.....	116
4. DISCUSSION.....	123
5. CONCLUSION	129
CHAPITRE 3 : IMPACTES DES ENDOMETRITES.....	130
1. INTRODUCTION	130
2. MATERIEL ET METHODES.....	130
3. RESULTATS.....	132
4. DISCUSSION.....	135
5. CONCLUSION	141
CHAPITRE 4 : OPTIMISATION D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC PRECOCE DES ENDOMETRITES.....	143
1. INTRODUCTION	143
2. MATERIEL ET METHODES.....	144
3. RESULTATS.....	152
4. DISCUSSION	170
5. CONCLUSION	172
CHAPITRE 5 : DÉPISTAGE IMMUNOLOGIQUE DES ENDOMETRITES CLINIQUES.....	173
1. INTRODUCTION	173
2. MATERIEL ET METHODES.....	175

3. RESULTATS.....	177
4. DISCUSSION.....	183
5. CONCLUSION.....	186
CONCLUSION GENERALE.....	187
RECOMMANDATION.....	190
RÉFÉRENCES.....	191
ANNEXES.....	207

Liste des abréviations

BCA: bicinchoninic acid assay

BCS: score corporel de l'engraissement (body corporal score).

BSA: bovine serum albumin

C5b: protéine du system de complément

DAMPs: damage-associated molecular patterns

DTT: Dithiothreitol

EC : endométrite clinique

ESC : endométrite subclinique

Hp : haptoglobine

IL- : interleukine

JPP : jours postpartum.

MAMPs : microbe-associated molecular patterns

MCV : mucus cervico-vaginal

Mmol/ml : micromole par millilitre.

NAC : N-acétyl-L-cystéine

NaCl: chlorure de sodium

OR: Odds-ratio

PBS: phosphate buffered saline

PMN : polymorphonucléaires

PNN : polynucléaires neutrophiles

SAA : amyloïde sérique A

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM: Standard error of the mean

Liste des tableaux

Tableau 1: Prevalence des endometrites en fonction de methode de diagnostic utilisee pour l'examen du contenu vaginal	35
Tableau 2: Comparaison de resultats de diagnostic des endometrites a l'aide d'un echographe en fonction du critere de positivite [59].....	36
Tableau 3: Criteres de diagnostic adoptes pour definir les endometrites chez la vache laitiere [69]..	41
Tableau 4: Classification des coupes de biopsies uterines chez la vache en fonction de l'etat inflammation de l'endometre.	42
Tableau 5: Criteres de diagnostic des endometrites chez la vache [59].	43
Tableau 6 : Seuils de positivite adoptes pour definir les endometrites chez la vache laitiere.	48
Tableau 7 : Repartition des vaches en fonction de l'etat inflammatoire de l'uterus selon la saison du velage.....	52
Tableau 8 : Recapitulatif des facteurs de risque qui influencent l'incidence des endometrites chez la vache laitiere (ec : endometrite clinique, esc : endometrite subclinique, met : metrite).	65
Tableau 9 : Mesure des performances reproductrices des vaches laitiere holstein avec endometrite et sans endometrite (n = 1865) [7].	68
Tableau 10 : Composition du crachat de l'etre humain analyse par un spectrometre releve une presence abondante des proteines associees a l'immunité innee [177].	72
Tableau 11 : Etudes visant a comparer les concentrations de biomarqueurs dans la cavite uterine (ut) ou le mucus vaginal (MV) entre individus sains ou presentant une pathologie.	77
Tableau 12 : Principales definitions utilisees pour classer la forme de l'endometrite.	94
Tableau 13 : Prevalence des endometrites	94
Tableau 14 : Exactitude et fiabilite des differents des methodes de diagnostic des endometrites (la cytologie uterine a ete utilisee comme diagnostic de reference).	97
Tableau 15 : Liste des variables enregistres	113
Tableau 16 : Repartition des vaches en fonction de la saison du velage	117
Tableau 17 : Repartition des vaches en fonction de la nature de velage	117
Tableau 18: Distribution des frequences des maladies metaboliques chez les vaches de l'etude.....	118
Tableau 19: Repartition des produits de velage selon le nombre, sexe et viabilite.	118
Tableau 20 : Prevalence des pathologies de la reproduction entre le velage et le jour de diagnostic des endometrites.....	118
Tableau 21 : Representation des vaches en fonction du bcs le jour de l'examen gynecologique.....	119
Tableau 22: Repartition des vaches en fonction du score total de proprete.....	119

Tableau 23 : Facteurs de risque de l'endometrite cytologique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	121
Tableau 24 : Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endometrite cytologique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	121
Tableau 25: Facteurs de risque de l'endometrite clinique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	122
Tableau 26: Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endometrite clinique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	122
Tableau 27 : Facteurs de risque de l'endometrite subclinique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	122
Tableau 28 : Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endometrite subclinique chez les vaches examinees entre 21-60 jpp.	123
Tableau 29 : Parametres de fecondite et fertillite de differents groupes de vaches classees en fonction de l'etat sanitaire de l'uterus.	134
Tableau 30 : Pourcentage de polynucleaires neutrophiles (pnn) et le ratio pnn sur les cellules epitheliales pour chaque vache durant les deux premieres semaines postpartum.	155
Tableau 31 : Concentration de proteine totale (mg/ml de mucus) dans le mcv traite avec 1 mm dtt (mcv-dtt) ou pbs (mcv-pbs) en utilisant la technique de bca.	156
Tableau 32: Concentration d'il-8 et d'il-6 (pg/ml de mucus) dans le mcv traite avec 1 mm dtt (mcv-dtt) ou avec pbs (mcv-pbs).	157

Table de figures

Figure 1 : Principe de la mise en place du metricheck®	33
Figure 2 : Interpretation du contenu vaginal en fonction de son odeur et sa couleur	34
Figure 3 : Histologie de l'uterus non gravide de la vache..	38
Figure 4: Representation schematique des differentes lesions de l'endometre.	39
Figure 5 : Montage de la cytobrosse sur le pistolet d'insemination artificielle pour le prelevement cytologique	45
Figure 6 : Frottis cytologiques endometriaux	47
Figure 7: Role de l'IL-6 dans la modulation de la phase aiguë de l'inflammation.....	79
Figure 8: Expression normale moyenne de l'ARN de l'IL-8 dans l'uterus, l'ovaire et la glande mammaire (mg) du buffle egyptien avec (w) et sans endometrite (w / o) en utilisant la PCR quantitative en temps reel.	80
Figure 9: Representation schematique des voies d'activation du complement.....	81
Figure 10: Eexamen transvaginal mettant en evidence une decharge uterine purulente	86
Figure 11 : Examen transvaginal mettant en evidence une decharge uterine mucopurulente.	86
Figure 12 : Dispositif de prelevement cytologique constitue d'une cytobrosse a usage humain montee sur un pistolet d'insemination.....	88
Figure 13 : Coloration des frottis cytologiques a l'aide d'un kit de mgg modifie a utilisation rapide. .	88
Figure 14 : Examen cytologique d'un frottis uterin, avec presence de polynucleaires neutrophiles...	89
Figure 15 : Examen cytologique de frottis uterins avec presence de cellules epitheliales glandulaires (a) et large amas de cellules epitheliales aglandulaires (b), avec quelques neutrophiles (*).	89
Figure 16 : Examen cytologique d'un frottis uterin avec presence de polynucleaires basophiles, signe d'une infestation parasitaire.	90
Figure 17 : Examen cytologique d'un frottis uterin avec presence de polynucleaires neutrophiles (n) et cellules epitheliales aglandulaires (e).....	91
Figure 18 : Courbe roc permettant d'etablir le taux seuil de neutrophiles entre 21 et 60 jpp chez la vache laitiere..	93
Figure 19: Frequence des endometrites en fonction des methodes de diagnostic.....	97
Figure 20: Grille d'evaluation de la condition corporelle (bcs)	110
Figure 21: Zones anatomiques a considerer pour la notation de l'etat de proprete des vaches.	111
Figure 22: Criteres de notation de l'etat de proprete des differentes regions anatomiques.....	112
Figure 23 : Representation schematique de methodes de traitement de mcv pour l'analyse de proteine totale et le dosage des cytokines et chimiokines.	146

Figure 24: Representation schematique de methodes de traitement du mcv pour l'optimisation de methode d'analyse de proteine totale (BCA assay).	148
Figure 25 : Representation schematique de methodes de traitement de mcv des vaches saines, collectes durant l'œstrus, en dehors du postpartum pour l'optimisation de methode d'analyse de proteine totale (BCA assay).	151
Figure 26: Image microscopiques de MCV representant une forte population de neutrophiles indiquant une inflammation severe.	153
Figure 27: Image microscopiques de MCV representant une legere population de neutrophiles et cellules epitheliales indiquant une inflammation moderee.	153
Figure 28: Image microscopiques de MCV representant un macrophage infestant une neutrophile.	154
Figure 29: Image microscopique de MCV representant un macrophage et une lymphocyte.	154
Figure 30: Comparaison entre la concentration de la proteine totale dans le mucus cervico-vaginal traite par PBS ou DTT.	155
Figure 31: Representation graphique de la concentration d'IL-8 (a) et IL-6 (b) dans le MCV collecte durant les deux premieres semaines postpartum et traite par DTT ou PBS.	156
Figure 32 : Correlation entre les concentrations de NAC (a) et DTT (b) ajoute au mucus du postpartum precoce et la concentration detectable de proteine totale en utilisant la technique de bca. ...	158
Figure 33: L'effet de l'ajout de methanol sur la concentration detectable de la proteine totale, en fonction de l'agent reducteur ajoute NAC (a), DTT (b) ou sans agent redacteur (0 µl).	159
Figure 34: Representation schematique de la migration de la proteine standard et des echantillons dans un gel de gradient a 4-20%, et le poids moleculaire des principaux marqueurs inflammatoires qui sont en relation avec l'endometrite.	160
Figure 35: Comparaison entre les resultats de la proteine totale et la SDS-PAGE en utilisant le nac comme agent reducteur dans le mucus collecte durant les deux premieres semaines postpartum.	161
Figure 36: Comparaison entre les resultats de la proteine totale et la SDS-PAGE en utilisant le DTT comme agent reducteur dans le mucus collecte durant les deux premieres semaines postpartum.	162
Figure 37: Correlation entre les concentrations de NAC (a) et de DTT (b) ajoutees au MCV collecte durant l'œstrus et la detectable concentration de la proteine totale en utilisant la technique BCA (moyenne ± sem).	164
Figure 38: L'effet de l'ajout de methanol sur la concentration detectable de la proteine totale, en fonction de l'agent reducteur utilise NAC (a), DTT (b) ou sans agent redacteur (0 µl) dans le MCV collecte durant l'œstrus au postpartum tardif.	165

Figure 39: Comparaison entre les resultats de la proteine totale et la SDS-PAGE en utilisant le NAC comme agent reducteur dans le mucus collecte durant l'œstrus plus tard au postpartum.....	166
Figure 40: Comparaison entre les resultats de la proteine totale et la SDS-PAGE en utilisant le DTT comme agent reducteur dans le mucus collecte durant l'œstrus plus tard au postpartum.....	167
Figure 41 : Correlation entre les concentrations de DTT / NAC ajoute au mucus collecte durant l'œstrus plus tard postpartum et la concentration detectable de l'IL-1 β en utilisant le technique elisa.	168
Figure 42: Representation graphique des resultats de detectable concentration d'IL-1 β dans le MCV collecte durant les deux premieres semaines postpartum ou durant l'œstrus et traite par DTT, NAC ou sans agent reducteur.	169
Figure 43 : Les pourcentages de neutrophiles, macrophages, lymphocytes et cellules epitheliales ont ete calcule dans le MCV collecte a 7 (a) et 21 (b) des vaches ulterieurement diagnostiquees comme atteintes d'endometrite clinique (ec ; n = 10) et saines (n = 10).....	179
Figure 44: Niveaux de la proteine totale dans les MCV collectes des vaches avec endometrites cliniques (n = 10) et des vaches saines (n = 10) a 7 et 21 jpp.....	180
Figure 45: IL-1 β , IL-6 et IL-8 ont ete mesurees dans les MCV collectes a 7 et 21 jpp chez les vaches avec ec (n=10) et vaches saines (n=10)..	181
Figure 46: SAA et Hp ont ete mesurees dans les MCV collectes a 7 et 21 jpp chez les vaches avec EC (n=10) et vaches saines (n=10).	182
Figure 47: C5b a ete mesure dans les MCV collectes a 7 et 21 jpp chez les vaches avec ec (n=10) et vaches saines (n=10).....	183
Figure 48: Coupe histologique au niveau de l'uterus montrant une forte congestion avec hemorragie de l'endometre (x 1000).	208
Figure 49: Coupe histologique montrant une forte infiltration leucocytaire du stratum compactum avec la disparition totale de l'epithelium endometrial (x 200).....	208
Figure 50: Coupe histologique montrant une forte congestion et hemorragie de l'endometre (x 600)	209
Figure 51: Coupe histologique montrant un epithelium endometrial intact, avec une rarete des glandes endometriales (x 400)	209
Figure 52: Coupe histologique montrant une forte dilatation kystique des glandes sous l'effet de l'etranglement et de l'obstruction de leurs canaux excreteurs (x 1000).	210
Figure 53: Coupe histologique montrant la disparition de l'epithelium endometriale avec une forte infiltration leucocytaire, notamment le stratum compactum. Congestion vasculaire est œdeme sont aussi remarquables (x 200).....	210

Figure 54: Coupe histologique montrant un endometre au debut de l'involution uterine (8 ^{eme} jour du postpartum).....	211
Figure 55 : Photos montrant une des etables concernees par l'etude immunologique du mcv (irlande).	215
Figure 56 : Photo montrant la technique de prelevement manuelle du mcv par voie vaginale	217
Figure 57 : Photo montrant la preparation des frottis cytologiques a partir du cvm.....	217
Figure 58 : Aspect macroscopique du MCV.....	218
Figure 59 : Frottis cytologique a partir du MCV montrant une squameuse cellule epitheliale vaginale. X400	220
Figure 60 : Frottis cytologique a partir du MCV montrant des cellules epitheliales vaginales epitheliale superficielles. X400.....	220
Figure 61 : Frottis cytologique a partir du MCV montrant des cellules epitheliales squameuses (#) et des cellules endometriales (*). X400.....	221
Figure 62 : Frottis cytologique a partir du MCV montrant une abondante infiltration leucocytaire. X200	221
Figure 63 : Frottis cytologique a partir du MCV montrant une abondante cellule de macrophage. X400	222
Figure 64 : Plaque de 96 trous pour le dosage de la proteine totale dans le MCV. L'analyse a ete faite en double.....	230
Figure 65 : Photos prise de l'ecran du lecteur du plaque elisa avec un programme de bca assay pour les proteines totales.....	230
Figure 66 : Photo du kite elisa pour le dosage d'IL-6 utilise dans cette etude.	234
Figure 67 : IL-6 : changement de couleur apres addition du substrat et incubation dans l'obscurite	234
Figure 68 : IL-6 ; changement de couleur apres l'addition de la solution d'arret	234
Figure 69 : Exemple de technique de SDS PAGE (sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis) pour la separation des proteines totales apres traitement avec differents protocoles d'homogeneisations de MCV.	236
Figure 70 : Photo du kite elisa pour le dosage d'IL-1 β utilise dans cette etude.	237
Figure 71 : IL-1 β ; changement de couleur apres addition du substrat et incubation dans l'obscurite	237
Figure 72 : IL-1 β ; changement de couleur apres l'addition de la solution d'arret	238
Figure 73 : Photos prise de l'ecran du lecteur du plaque elisa pour la plaque de IL-1 β	238
Figure 74 : Dosage d'IL-8 : changement de couleur apres addition du substrat et incubation dans l'obscurite	239
Figure 75 : IL-8 ; changement de couleur apres l'addition de la solution d'arret	239

Introduction générale

L'endométrite est considérée comme un problème de reproduction très coûteux chez la vache laitière. L'incidence globale de l'inflammation utérine chez la vache est très variable 6.25%-75% [1-4]. Dans plusieurs pays, y a compris l'Algérie, l'endométrite est souvent sous-estimée du fait au manque de données sur la prévalence réelle de l'endométrite clinique et subclinique et surtout l'impact économique de chaque forme. Le problème de l'infertilité est rapporté dans plusieurs pays [5-8] y a compris l'Algérie. L'endométrite est en relation directe avec cette diminution de fertilité, en augmentant l'intervalle vêlage-vêlage, le nombre d'insémination pour avoir une gestation, tout en diminuant la production laitière [7-9]. De ce fait, une vache avec endométrite passe peu de temps en pic de lactation, ce qui induit une perte de production laitière de 3.7 kg/jour [7, 10, 11]. Même après la résolution des signes cliniques de la maladie, la fertilité reste au-dessous de la recommandation [12]. Les conséquences de l'inflammation utérine sur la fertilité, la production laitière et le coût direct du traitement chargent les éleveurs €705-€1,523/vache/mois (86,486-186,834 DZD : taux de change le 04/07/2017), si l'endométrite est diagnostiquée uniquement dans 10% du cheptel bovin [13].

Selon les définitions récentes proposées par Sheldon et al. [14], l'endométrite puerpérale est représentée par une décharge vaginale rouge-marron et d'odeur fétide associée à une atteinte de l'état générale de l'animal notamment une fièvre <39.5°C, alors que l'endométrite clinique concerne les animaux avec une décharge vaginale purulente détectable avant 21 jours postpartum (JPP) sans aucun signe systémique [14]. L'endométrite clinique est caractérisée par une décharge vaginale purulente ou muco-purulente détectables après 21 JPP et 26 JPP, respectivement [14]. En absence de signe clinique, l'endométrite subclinique est définie selon la période du postpartum par un taux de neutrophile >8% dans les prélèvements cytologiques réalisés entre 21-33 JPP, ou >6% entre 34-46 JPP ou bien >4% après 48 JPP [15]. La pyomètre représente une forte accumulation de pus dans l'utérus avec un col fermé associé à un corps jaune persistant [14].

L'endométrite sous ces deux formes clinique et subclinique affecte négativement les performances de la reproduction de la vache, notamment par un retard de la reprise de l'activité ovarienne, augmentation de nombre d'insémination pour avoir une gestation ce qui

augmente l'intervalle vêlage-insémination fécondante avec une diminution de taux de gestation [16-18]. Puisqu'il s'agit d'une maladie multifactorielle, la prévalence des endométrites est influencée par plusieurs facteurs comme la rétention placentaire, métrite, hypocalcémie, gestation gémellaire et dystocie [19, 20]. A travers les enquêtes réalisées pour la détermination des facteurs de risques, les chercheurs ont trouvé que ces derniers varient d'un pays à un autre et d'une étude à une autre [8, 20-24].

L'endométrite subclinique est largement rependue que l'endométrite clinique. Bien qu'il existe plusieurs méthodes de diagnostic, à savoir la palpation transrectale de l'utérus, l'examen vaginoscopique de la muqueuse vaginale, l'examen de la décharge vaginale, la microbiologie utérine, la biopsie utérine et la cytologie utérine, cette dernière représente la seule méthode qui permet le diagnostic de la forme subclinique. En revanche, la prévalence des endométrites subcliniques varie en fonction de pourcentage de neutrophile utilisé comme un seuil de référence pour différencier les vaches atteintes d'endométrites des vaches indemnes.

Les objectifs de notre étude sont ;

- 1) La mise en application des techniques de diagnostic à savoir la cytologie et la biopsie utérine pour le diagnostic de la forme subclinique de l'endométrite.
- 2) La détermination de la prévalence des endométrites sous ses deux formes clinique et subclinique tout en calculant le seuil de neutrophile spécifique aux élevages de l'étude.
- 3) La détermination des facteurs de risque qui peuvent influencer la prévalence des endométrites dans les élevages laitiers Algériens.
- 4) L'évaluation de l'impact des endométrites sur les performances de la reproduction dans les élevages de la présente étude.
- 5) Le développement d'une nouvelle technique de diagnostic, facile, précise et sans danger sur la santé de l'animale.

Première partie

Revue bibliographique

CHAPITRE 1 : ÉPIDÉMIOLOGIE DES ENDOMETRITES

1. Définition :

Chez la vache 75% des pathologies telles que la fièvre du lait, la cétose, le déplacement de la caillette, la rétention placentaire et les pathologies utérines s'installent durant les 30 premiers jours postpartum [21, 25]. Les bactéries sont isolées chez 80% des vaches durant les deux premières semaines suivant le part [26] et sont impliquée dans cinq types d'infections utérines : métrite puerpérale, métrite clinique, endométrite clinique, endométrite subclinique et pyomètre.

Du point de vue histologique, la métrite est une inflammation profonde des couches utérines, qui touche l'ensemble des couches endométriale et myométriale [27]. L'endométrite est une inflammation superficielle de l'endomètre dont l'inflammation ne dépasse pas la profondeur du stratum spongium [27]. L'endométrite aigue se caractérise par une fibrose, leucocytose, disparition des glandes endométriales avec atrophie de l'endomètres. Ces signes persistent même après la guérison [14]. Contrairement à l'endométrite, la métrite se caractérise par congestion, œdème, infiltration leucocytaire et dégénérescence du myomètre plus l'endomètre [14].

Métrite puerpérale est définie comme étant une infection utérine qui se traduit par une décharge utérine rouge-marron associée à une atteinte de l'état générale de l'animal notamment la fièvre ($>39.5^{\circ}\text{C}$), alors que la métrite clinique n'est pas associée à des signes systémiques [7, 14, 26]. Les deux formes de métrites sont détectables avant la troisième semaine postpartum [14]. L'endométrite clinique est caractérisée par une décharge vaginale purulente ou muco-purulente au-delà du 21^{ème} et 26^{ème} jour postpartum (JPP), respectivement [7]. Dans l'absence de signes cliniques, l'endométrite subclinique est définie selon la période du postpartum par la présence de $>8\%$ de polymorphonucléaire neutrophiles (PMN) dans les prélèvements de la cytologie utérine réalisés à 21-33 JPP, $>6\%$ PMN à 34-46 JPP ou 4% PMN après 48 JPP. Les deux formes d'endométrites n'ont associé à aucun signe clinique systémique [15]. Le pyomètre est caractérisé par une forte accumulation du matériel purulent dans la lumière utérine avec la présence d'un corps jaune persistant et un col utérin fermé [14].

Sur le plan immunologique, l'endométrite est définie comme étant une inflammation persistante de l'endomètre qui se prolonge au-delà du 21^{ème} JPP [7, 14, 28].

2. Étiopathogénie :

Bien qu'il existe plusieurs bactéries qui sont incriminées dans les infections utérines, *Escherichia coli* et *Trueperella pyogenes* représentent les bactéries les plus fréquemment isolées de la lumière utérine dans le cas d'infection endométriale chez la vache, et qui sont souvent associées à d'autres bactéries telles que *Provetella spp*, *Fusobacterium necrophorum* et *Fusobacterium nucleatum* [3, 14, 29-34].

En revanche, avec le progrès de la science et l'utilisation de la nouvelle technologie telle que RT-PCR et next generation sequencing, on a commencé à mettre en doute la relation de causalité entre l'isolement de bactéries de l'utérus et l'endométrite [35]. Jeremejeva et al. [36] ont rapporté que vingt échantillons sur 56 (35,7%) avaient un pourcentage élevé de neutrophiles mais pas de bactéries dans l'utérus. La réaction inflammatoire dans ce cas n'est pas corrélée, ou du moins non initiée par des bactéries. En outre, les mêmes auteurs ont signalé que 4 des 20 échantillons bactériologiquement positifs (7,1% du nombre total d'échantillons) ne démontraient aucune preuve cytologique de l'inflammation. Dans une autre étude, 31% des vaches souffrant d'endométrite clinique avaient une cytologie utérine négative, alors que aucune bactérie n'a été isolée chez des vaches atteintes d'endométrite subclinique [15].

Par conséquent, il semble qu'il y a une corrélation faible et non significative entre le résultat cytologique et bactériologique dans l'utérus durant le postpartum. L'inflammation utérine stérile peut expliquer cette cytologie utérine positive dans des échantillons bactériologiquement négatifs, car les protéines de la phase aiguë sont déjà secrétées à des niveaux élevés dans l'endomètre deux semaines avant le vêlage [37] pour se préparer à l'inflammation utérine physiologique du postpartum, nécessaire à l'involution utérine. L'infestation fongique ou l'infection mycobactérienne de l'utérus peut également expliquer les divergences [36].

Dans un travail très intéressant et en utilisant l'électrophorèse sur gel de dénaturation par PCR (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) et le pyroséquençage de l'ADN

pour fournir une description de la diversité bactérienne dans utérus des vaches saines, avec métrite ou endométrite, Sants et Bicalho [38] ont constaté que *E. coli* et *T. pyogenes* n'ont pas été détectés de manière significative dans aucun groupe de vaches et ils proposent que d'autres groupes et, en particulier, des microorganismes jusqu'à présent non cultivés ou non identifiés, pourraient avoir un rôle clé dans l'établissement de cette pathogénie, mais même les agents pathogènes connus pourraient avoir un rôle mineur dans la pathologie utérine. De plus, les auteurs ont indiqué que la diversité des bactéries dans les groupes ci-dessus changeait dynamiquement du jour au lendemain quel que soit l'état de santé des vaches. Ces types d'observations soulèvent la question de savoir si le microbiome joue un rôle causal dans la détermination des différents niveaux de maladies, ou si les déséquilibres microbiens sont simplement une conséquence de la maladie comme une surinfection et de nombreux autres facteurs dépendants de l'hôte, tels que l'âge, le statut immunitaire et les facteurs indépendants de l'hôte (i.e. l'environnement) contribuent à provoquer la maladie chez les vaches postpartum [38].

3. Diagnostic :

Le diagnostic précoce des infections utérines notamment les endométrites représente la clé de réussite de la gestion de reproduction chez la vache laitière. L'endométrite serait responsable de 40-60% des troubles de fertilité et des pertes économiques non négligeables à travers le monde entier [16-18, 26, 39]. Du fait qu'il existe plusieurs formes d'endométrite ; clinique, subclinique et plus récemment en parle de l'endométrite cytologique [14, 28, 40], il est devenu indispensable d'adapter chaque méthode de diagnostic avec les nouvelles définitions de chaque forme clinique en vue d'augmenter la précision de diagnostic. En comparaison avec l'examen clinique du contenu vaginal, l'ultrasonographie, la biopsie utérine et la bactériologie, la cytologie utérine est sans doute la méthode de référence pour le diagnostic de toutes les formes d'endométrite notamment la forme subclinique qui reste indétectable par les autres techniques de diagnostic [3, 40, 41]. De ce fait, la prévalence de chaque forme d'endométrite varie en fonction de la méthode de diagnostic utilisée ainsi que les critères d'interprétation adoptés [14, 16-18, 26, 28, 39, 40].

3.1. Palpation transrectale

3.1.1. Principe

C'est une méthode de diagnostic qui permet de mettre en évidence les modifications physiques de l'utérus. La technique consiste à palper le col et les cornes de l'utérus en vue d'estimer la taille ou le diamètre, la consistance et la mise en évidence d'un éventuel contenu dans les cornes utérin [42].

3.1.2. Matériels et Mise en œuvre

Après avoir assuré une bonne contention de la vache, le rectum doit être bien vidé de ses matières fécales en utilisant des gants d'examen gynécologique bien lubrifiés. Avec une main ouverte on essaye de repérer les différentes parties anatomiques de l'utérus notamment le col et les cornes. Avec une palpation douce de ces parties anatomiques on doit avoir une idée sur leurs tailles et consistances et s'il y a du liquide à l'intérieure. Par un massage sur le plancher du rectum on favorise la sortie de ces liquides par la voie vaginale [43].

3.1.3. Critères et intérêts du diagnostic

La vache est considérée comme atteinte d'endométrite si elle présente un col avec un diamètre supérieur à 7 cm [7] ou la taille de l'une des deux cornes est 1,5 à 2 fois supérieure à l'autre [44] ou bien les deux cornes sont de 4 cm de diamètre avec une consistance ferme, dépourvues de caroncules, sans adhérence, à lumière imperceptible et non fluctuante [45].

Cette méthode de diagnostic donne beaucoup de faux positifs vu que les modifications anatomo-morphologique de l'utérus sont considérées comme un phénomène physiologique qui varie selon le stade du cycle œstral de la vache [46]. En plus, la consistance de l'utérus est en 66% des cas n'est pas en relation avec l'infection endométriale et peut être même expliqué par la présence d'un fœtus ou une morallité embryonnaire précoce [3, 7, 14, 47]. De ce fait, ces critères ne sont pas vraiment spécifiques à l'infection utérine.

Bien que cette technique de diagnostic soit rapide, facile à mettre en œuvre et surtout économique, elle ne permet de diagnostiquer que la forme clinique des endométrites. Mais du fait qu'elle est subjective et ses résultats varient en fonction du praticien, elle est considérée comme une méthode de faible sensibilité.

3.2. Contenu vaginal

3.2.1. Principe

L'examen du contenu vaginal représente un outil de diagnostic des endométrites, largement utilisé par les vétérinaires praticiens à travers le monde entier. Du fait de l'impossibilité d'examiner le contenu utérin à l'œil nu, l'examen du contenu vaginal consiste à mettre en évidence les sécrétions utérines au niveau du vagin en utilisant plusieurs moyens à savoir, le speculum vaginal, le vaginoscope, le Metricheck et la main gantée [48]. La sécrétion vaginale sera ensuite un sujet d'évaluation visuelle et olfactive [49, 50].

3.2.2. Matériels et Mise en œuvre

Avant d'entamer l'examen proprement dit, il faut assurer une bonne contention de l'animal. Ensuite la région pelvienne est bien nettoyée avec la povidone iodé et séchée à l'aide d'un papier absorbant.

a) Metricheck

C'est un dispositif de 50 cm de longueur (Cf. Figure 1) en inox doté à son extrémité d'une tête hémisphérique en silicone de 4 cm de diamètre. Le dispositif est introduit à travers les vulves vers l'orifice caudal du col utérin. Ensuite le dispositif est retiré vers l'arrière et les substances qui s'adhèrent sur la tête de silicone seront évaluées juste après [48].

b) Speculum

Le spéculum est inséré dans le vagin suffisamment profond pour permettre la visualisation de l'orifice cervical externe et la partie latérale, dorsale et ventrale de la paroi vaginale. On doit utiliser une source lumineuse pour faciliter l'examen de la lumière vaginale [48].

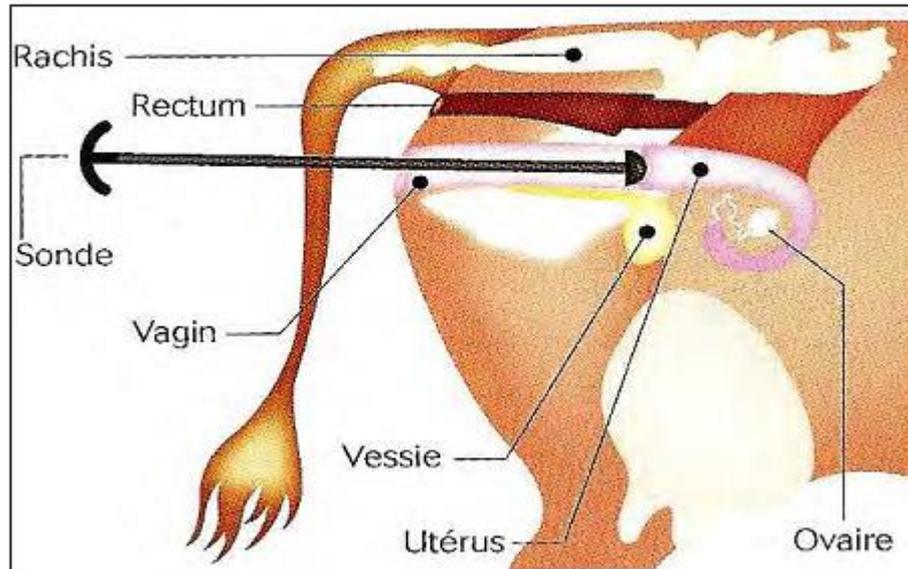


Figure 1 : Principe de la mise en place du Métrichек® [51].

c) Vaginoscope

Le vaginoscope est un dispositif intra-vaginal en forme tubulaire, de 5 x 42 cm. Il est produit soit du plastique, soit du carton, soit de l'inox [52]. Son utilisation est identique à celle du speculum sauf que le vaginoscope est dépourvu d'une source lumineuse.

d) Main gantée

Une main gantée est introduite dans le vagin, après quoi l'orifice externe du col et la partie latérale, dorsale et ventrale de la paroi vaginale sont palpés. Après avoir retiré la main gantée, le mucus adhérent sur le gant est ensuite inspecté [48].

Quel que soit la méthode utilisée, le contenu vaginal est classé selon Williams et al. [53] (Cf. Figure 2). Les endométrites sont définies par la présence d'une décharge utérine purulente ou sanguinolente (catégorie 3) détectable dans le vagin à partir du 21^{ème} JPP ou une décharge utérine muco-purulente (catégorie 2 ou 3) détectable dans le vagin après le 26^{ème} JPP. Une décharge utérine d'odeur fétide est aussi considérée comme un signe d'endométrite. Selon une étude récente, Madoz et al. [15] considèrent les vaches avec une sécrétion vaginale de score 1, 2 ou 3, entre 31-59 JPP comme atteintes d'endométrites cliniques.

3.2.3. Critère, intérêts et limites du diagnostic

La qualité et la quantité des sécrétions vaginales reflètent les bactéries incriminées dans l'infection utérine ainsi que la réponse immunitaire qui en résulte [53]. En utilisant la cytologie utérine comme un diagnostic de référence, l'examen vaginoscopique de la sécrétion vaginale

donne une sensibilité et spécificité de 53,9 % et 95,4 %, respectivement [41]. Cependant la vaginoscopie, est rarement utilisée comme un outil de diagnostic des endométrites et peut être vue par les cliniciens comme gênant malgré sa simplicité et rapidité [7]. Le Metricheck et la main gantée sont considérées comme des méthodes avec une forte exactitude et parfaitement adaptées à l'examen du contenu vaginal en vue de diagnostic des endométrites, car elles sont rapides, faciles et plus commodes pour les praticiens [30, 54].



Proportion de pus :

- 0 point : Mucus clair et translucide
- 1 point : Mucus contenant des flocons blancs
- 2 points : Moins de 50 mL d'exsudat contenant moins de 50% de matériel mucopurulent, blanc
- 3 points : Plus de 50 mL d'exsudat contenant du pus blanc ou jaunâtre et occasionnellement sanguinolent

Odeur du pus :

- 0 point : Odeur normale
- 1 point : Odeur fétide

Figure 2 : Interprétation du contenu vaginal en fonction de son odeur et sa couleur [53].

Quel que soit le moyen de diagnostic utilisé, l'examen de la sécrétion vaginale permet de prévenir les problèmes des performances de la reproduction. Pleticha et al. [48] ont constaté que le taux de réussite à la première insémination et le taux de conception sont faibles chez les vaches avec une sécrétion vaginale de score 2 ou 3 par rapport aux vaches avec un score 0 ou 1.

L'examen du contenu vaginal à l'aide de speculum, Metricheck ou main gantée représentent des techniques de diagnostic clinique qui n'affectent pas le taux de conception chez la vache [48]. Ces techniques de diagnostic sont sans aucun danger sur la santé de la vache. Sheldon et al. [30] ont constaté que la main gantée n'est pas considérée comme une

source de contamination bactérienne du vagin et ne retarde pas le processus de l'involution utérine.

Bien que le Metricheck donne toujours une prévalence d'endométrites plus élevée par rapport aux autres outils de diagnostic, le choix de cette dernière n'affecte pas le taux d'amélioration des performances de la reproduction après traitement des vaches malades. De ce fait, le choix de l'outil de diagnostic utilisé dans l'examen de la sécrétion vaginale est basé surtout sur sa simplicité et la facilité de mise en œuvre [48]. Il faut mentionner que cette méthode de diagnostic, quel que soit l'outil utilisé ne permet de diagnostiquer que la forme clinique des endométrites. Le tableau suivant (Cf. Tableau 1) résume les principales études qui ont été faites en utilisant les différents outils de l'examen de la décharge vaginale ainsi que les résultats qu'ont été obtenues.

Tableau 1: Prévalence des endométrites en fonction de méthode de diagnostic utilisée pour l'examen du contenu vaginal

Moyen de diagnostic	Jour d'examen (Postpartum)	Prévalence des endométrites cliniques	Référence
Speculum	21-27	36.9%	[48]
	22-28	34%	[55]
Vaginoscope	17-49	42%	[54]
	25±1	35.7%*	[56]
Metricheck	21-27	47.5%	[48]
	17-49	60%	[54]
Main gantée	21-27	36.8%	[48]
	18-38	35%	
	32-52	18%	[57]

3.3. Échographie

3.3.1. Principe

C'est une technique de diagnostic qui permet, en utilisant un échographe, l'examen du contenu utérin ainsi que l'épaisseur de la paroi de l'utérus [58].

3.3.2. Matériels et Mise en œuvre

Après avoir fait une bonne contention de la vache, en utilisant des gants de vêlage on procède à une bonne vidange du rectum. Avec une bonne lubrification de la sonde échographique, cette dernière est introduite dans le rectum en vue d'examiner les différentes

parties anatomiques. La technique consiste à déterminer le diamètre du col et de la corne précédemment gravide. De plus, la présence du liquide dans l'utérus est considérée comme un diagnostic positif d'endométrite [59].

3.3.3. Critère et intérêts du diagnostic

La taille du col et de la corne précédemment gravide ainsi que celle de la base de corne sont classées comme petite, moyenne et grande (< 3.5, 3.5 - 5.0, et > 5 cm, respectivement), selon la classification de Kasimanickam et al. [40]. Un diamètre de 5 cm est utilisé pour différencier les vaches atteintes d'endométrites clinique des vaches indemnes, selon le concept établi par Elliot et al. [60].

Bien qu'elle ne soit pas associée à une inflammation endométriale que dans 55% des cas, présence du liquide au niveau de l'utérus est toujours associée à une détérioration des performances de la reproduction [40]. L'évaluation échographique de l'utérus est considérée comme une technique de diagnostic facile et avec résultats interprétables [61]. Ainsi, la mise en évidence à l'aide d'un échographe du liquide intra-utérin 3 semaines postpartum représente une méthode de diagnostic fiable, avec une bonne sensibilité et spécificité en vue de diagnostiquer les endométrites cliniques chez la vache laitière.

La combinaison des deux critères de diagnostic, soit la présence du liquide intra-utérin et un diamètre de col ou de corne supérieure à 5 cm (Cf. Tableau 2) donne des résultats meilleurs que ceux donnés par chaque critère séparément [59].

Tableau 2: Comparaison de résultats de diagnostic des endométrites à l'aide d'un échographe en fonction du critère de positivité [59].

Critère de diagnostic	N° positif / total	Sensibilité %	Spécificité %	K ² (p)
Liquide intra-utérin (LIU)	37/76	88	62	0.33 (0.0004)
Diamètre du col utérin (> 5 cm) (DCol)	25/76	56	73	0.25 (0.02)
Diamètre de la corne utérine précédemment gravide (> 5 cm) (DCorn)	24/76	38	70	0.06 (0.57)
LIU + DCol	15/76	50	88	0.39 (0.001)
LIU + DCorn	15/76	38	85	0.23 (0.04)
DCol + DCorn	12/76	31	88	0.22 (0.056)
LIU + DCol + DCorn	9/76	31	93	0.29 (0.006)

K² : coefficient de concordance

3.4. Histologie

3.4.1. Principe

La biopsie utérine est basée sur l'étude des modifications histologiques rencontrées dans le cas d'une infection endométriale. Cette méthode a été utilisée depuis longtemps, chez la jument, comme la méthode de référence pour le diagnostic des infections utérines [62-68]. Plusieurs chercheurs ont essayé d'adapter cette méthode pour qu'elle devienne compatible avec le diagnostic des infections utérines chez la vache. En 1991, Bonnett et al. [29, 69, 70] ont fait un travail remarquable en vue de fixer les différents critères histologiques et anatomopathologiques qui peuvent être utilisés dans le diagnostic des endométrites chez la vache laitière. Aujourd'hui la biopsie utérine est devenue une méthode de diagnostic largement utilisée chez les bovins, dans le domaine de recherche pour la détection des différents anomalies et pathologies de la reproduction [4, 15, 59, 71, 72].

3.4.2. Matériels

Un fragment de tissu endométrial est prélevé à l'aide d'une pince à biopsie spécialement conçue pour les grands animaux. Bien qu'il existe plusieurs modèles avec plusieurs mensurations et formes, on utilise généralement une pince de 53 cm de longueur avec une tête à deux mâchoires avec des bords tranchantes de 6 x 4 mm [72]. La pince doit être bien nettoyée et désinfectée avant d'être introduite dans le vagin.

3.4.3. Mise en œuvre

Tout d'abord, il faut assurer une bonne contention de l'animal puis l'appareil génital externe doit être bien lavé et séché [62, 73]. Une main gantée est introduite dans le rectum. Après avoir vidé ce dernier, le col de l'utérus est saisi pour faciliter le passage de la pince à biopsie [59]. Par voie vaginale, la pince à de biopsie est introduite dans l'utérus. Après avoir passé le col utérin, au niveau de la corne, la tête de l'instrument est ouverte et à l'aide de la main introduite par voie rectale, un fragment de muqueuse est introduit entre les dents de la tête de la pince à biopsie et on referme les mâchoires sur le tissu [15].

Généralement la biopsie se fait au niveau de la corne précédemment gravide [59]. Certains auteurs [69, 70], pour un diagnostic plus précis recommandent la réalisation de trois prélèvements, dans les deux cornes et dans le corps utérin. Le site idéal pour la biopsie est la partie dorso-médiale de la corne juste en avant de la bifurcation [65, 74].

Ensuite le fragment prélevé est directement placé dans une solution fixatrice à base de formol à 10%, avec un volume de rapport 1 pour 10 et conservé jusqu'au jour de la préparation des coupes histologiques [15, 59].

A. Préparation des coupes histologiques

Dans un laboratoire spécialisé, les fragments sont réhydratés dans l'alcool éthylique à différents gradients de concentration, puis incluses dans des blocs de paraffines. A l'aide d'un microtome les blocs de paraffines sont coupés avec une épaisseur de 5 à 8 μm . Les coupes histologiques ainsi produites sont colorées par hématoxyline-éosine [15, 73].

B. Lecture des coupes histologiques

Les éventuelles modifications pathologiques sont recherchées avec méthodologie en commençant par observer la lumière utérine puis en progressant vers l'épithélium luminal, le stratum compactum et spongium, les glandes, les vaisseaux pour finir par le myomètre (Cf. Figure 3). Les critères énumérés ci-dessous sont ceux communément admis par les différents auteurs [62, 64, 69].

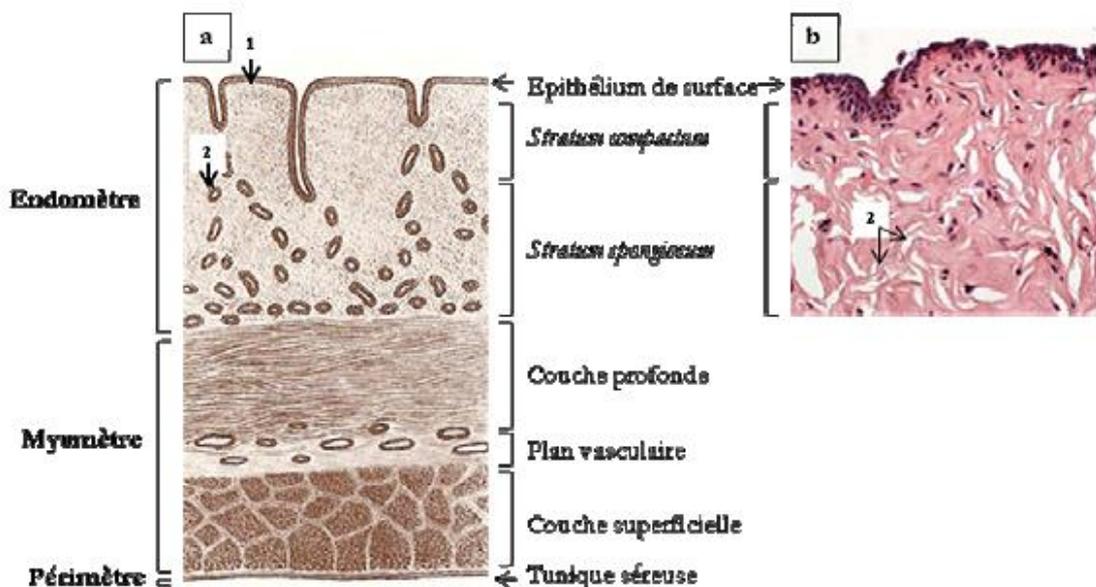


Figure 3 : Histologie de l'utérus non gravide de la vache. a. Aspect schématique [50]. b. Coupe histologique d'endomètre bovin après biopsie utérine (5 à 8 μm d'épaisseur) colorée à l'hématoxyline – éosine, 1. Membrane basale, 2. Glandes utérines [75].

Les principales lésions histologiques recherchées pour le diagnostic des endométrites chez la vache laitière sont, l'inflammation de l'endomètre, la fibrose péri-glandulaire et périvasculaire, les lésions périvasculaires et kystiques. La figure 4, proposée par Ginther [76] résume les principales lésions histologiques en cas d'inflammation utérine .

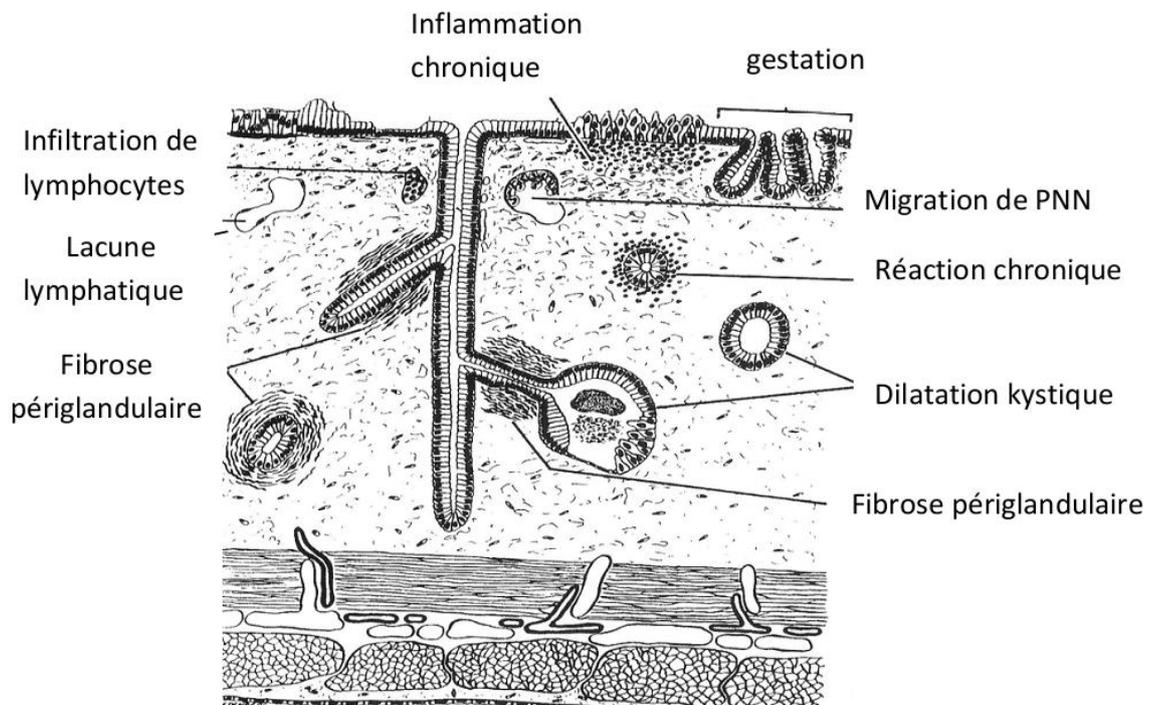


Figure 4: Représentation schématique des différentes lésions de l'endomètre [76].

a) Inflammation

Les cas modérés et sévères d'endométrites sont plus faciles à diagnostiquer sur la base d'une augmentation de nombre de cellules inflammatoires à travers le stratum compactum et le stratum spongium. Les cellules inflammatoires sont en faible proportion dans les cas d'endométrites moins sévères [77].

L'inflammation du stratum compactum, augmente le risque de détérioration des performances de la reproduction [78]. Plus le nombre de foyers lymphocytaires est important plus le pronostic est moins favorable, selon Studer et Morrow [79].

De façon plus objective, l'inflammation de l'endomètre est classée comme suite [15]

- Aucun signe d'inflammation.
- Faible inflammation.
- Inflammation modérée.
- Inflammation sévère.

b) Fibrose

Dans l'endomètre normal il n'y a pas de collagène stromal autour des branches glandulaires. Les cellules stromales, normalement présentes au niveau de la lamina propria, peuvent produire le collagène en réponse à un facteur agressif ou stimulant. La mauvaise formation en « nid » des branches des glandes au sein de la fibrose peut avoir lieu autour des points de branchement péri-glandulaire (Cf. Figure 4). Il faut signaler que ce type de déformation en « nid d'abeille » n'est pas toujours d'origine pathologique car on peut le trouver physiologiquement pendant l'œstrus [64, 80]. De façon plus objective, la fibrose est classée selon le nombre de couche de fibrose, comme suite [59]:

- Absent : 0 couche de fibrose.
- Légère : 1-3 couches.
- Modéré : 4-5 couches.
- Sévère : ≥ 6 couche.

Le degré de la fibrose péri-glandulaire est en relation négative avec les chances de conception suite à une insémination [77].

c) Lacunes lymphatiques

Ces lésions résultent d'une mauvaise perfusion vasculaire de l'utérus [81] (Cf. Figure 4). Le défaut de motricité utérine est considéré comme un des facteurs prédisposant à l'installation des lacunes lymphatiques [82, 83].

d) Dilatation kystique des glandes

Sous l'effet de l'obstruction et de rétrécissement de leur canal, les glandes se dilatent de façon exagérée ce qui perturbe leurs pouvoir excréteur pour assurer une bonne cyclicité [84] (Cf. Figure 4).

Jusqu'à aujourd'hui on n'est pas encore arrivé à standardiser les critères de diagnostic anatomo-pathologique utilisés pour différencier les animaux malades des animaux indemnes d'endométrites. Plusieurs critères et interprétations sont proposés (Cf. Tableaux 3-5).

A partir de la classification proposée par Chapwanya et al. [85], Madoz et al. [15] ont donné une classification plus simple pour le diagnostic des endométrites subcliniques, basée uniquement sur le degré de l'infiltration leucocytaire (Cf. Tableau 4). Les vaches sont

considérées comme indemnes d'endométrites uniquement si elles ne présentent aucune infiltration leucocytaire.

Tableau 3: Critères de diagnostic adoptés pour définir les endométrites chez la vache laitière [69].

	Critère	Évaluation subjective	Evaluation quantitative
Biopsie	Lisibilité	Illisible, Bonne lisibilité, Excellente lisibilité.	Nombre de zone ou l'épithélium est mesurable
	Hauteur	Cylindrique, Cuboïde, Aplatie	Epithélium intacte mesurée à 40x
Épithélium	Cellules inflammatoires	Mononucléaires, polynucléaires	Nombre 40x
	Cellules inflammatoires	Mononucléaires, polynucléaires	Nombre au-dessous de la membrane basale 63x
Stratum compactum	Foyers lymphocytaires		Nombre 10x
	Foyers lymphocytaires		Nombre 10x
Stratum spongium	Concentration	Absentes, Dispersées, Modéré, Forte	Nombre au-dessous de la membrane basale 10x
	Type	Droites, Enroulées	
	Taille	Glandes Dilatées : présence, Absence	Diamètre glandulaire interne et externe
	Fibrose	Présente, Absente	Maximum et minimum nombre de couche aux tours des glandes

Tableau 4: Classification des coupes de biopsies utérines chez la vache en fonction de l'état inflammation de l'endomètre.

Classe	Critères	
	Chapwanya et al. [85]	Madoz et al. [15]
0 : aucun signe d'inflammation	Tissu utérin inerte, quiescent	Aucune infiltration leucocytaire
1 : faible inflammation	Légère infiltration par les lymphocytes et les plasmocytes Quelques zones de fibrose Dégénérescence kystique des glandes Modification vasculaires	Légère infiltration leucocytaire
2 : inflammation modérée	Présence leucocytaire importante, Quelque fibrose périglandulaire ou périvasculaire, Importante dégénérescence kystique des glandes	Importante infiltration leucocytaire
3 : inflammation sévère	Forte infiltration par les poly-morpho-nucléaires, Atrophie glandulaire, Dégénérescence kystique et nécrose, Fibrose extensive des vaisseaux sanguins, Infiltration endométriale par les neutrophiles et les macrophages, Sites d'œdèmes isolés, Congestion vasculaire, Hémorragie, Lésions ou perte de l'épithélium	Infiltration leucocytaire très importante

Tableau 5: critères de diagnostic des endométrites chez la vache [59].

Variable	Catégorie
ÉPITHÉLIUM	
Hauteur	Cylindrique, Cuboïde, Aplatie
Lésion épithéliale	Absentes Légère Modérée Ulcère
Type de cellule inflammatoire	Absentes Mononucléaire Polynucléaires
Degré de l'infiltration	Absente Légère (≤ 5 cellules/cho X40) Modérée ($\geq 6-10$ cellules/cho x40) Sévère (>10 cellules : cho X40)
LAMINA PROPRIA	
Type de cellule inflammatoire	Absentes Mononucléaire Polynucléaires
Degré de l'infiltration	Normale (≤ 20 cellules/cho X40) Légère ($\geq 21-40$ cellules/cho x40) Modérée ($\geq 41-70$ cellules/cho X40) Sévère (>70 cellules/cho X40)
Agrégations lymphocytaires	Absente Légère (≤ 3 agrégats/cho X10) Modérée ($\geq 4-5$ cellules/cho x10) Sévère (≥ 6 cellules/cho X10)
GLANDE ENDOMETRIALE	
Atrophie ou dilatation	Absente Présente
Fibrose	Absent Légère (1-3 couches/cho X40) Modéré (4-5 couches/cho X40) Sévère (≥ 6 couches/cho X40)
VASCULARISATION	
Dégénérescence vasculaire	Absente Présente
Hémorragie	Absente Présente
Macrophages hémossidérines	Absente Présente

Cho : lecture au niveau d'un champ d'observation au grossissement X 40 ou X 10.

3.4.4. Critère, intérêts et limites du diagnostic

Parfois les tissus prélevés par biopsie utérine ne sont pas interprétables, Bonnett et al. [78] ont trouvé que seulement 70% des prélèvements sont lisibles. De même, Meira et al. [59] ont trouvé un pourcentage de 60% des coupes histologiques interprétables.

La sensibilité et spécificité de la biopsie utérine varient en fonction de la méthode de référence. En adoptant le diagnostic de gestation à 120 jours postpartum comme diagnostic de référence, Bonnett et al. [78] ont trouvé une sensibilité et spécificité de 92% et 77%, respectivement. Meira et al. [59] ont trouvé une sensibilité et spécificité de 44% et 92%, en utilisant la cytologie utérine comme diagnostic de référence. Il semble aussi que les résultats de la biopsie utérine sont influencés par le stade cyclique de la vache [15]. Selon ces derniers auteurs, la biopsie utérine ne représente pas une bonne méthode de diagnostic des endométrites subclinique car elle est beaucoup plus sensible dans le diagnostic de la forme clinique où l'état sanitaire de l'utérus est gravement détérioré.

L'innocuité de la biopsie utérine est toujours un sujet de discussion. Bonnett et al. [78] ont constaté que cette technique de diagnostic peut provoquer une détérioration des performances de la reproduction de la vache. Par contre DeBois et Manspeaker [77] et Chapwanya et al. [72] ont démontré que la biopsie utérine est une technique qui ne présente aucun danger ni sur la santé de la vache ni sur sa vie reproductive. Selon Meira et al. [59] l'innocuité rencontrée dans l'étude de Bonnett et al. [78] serait due au fait que ces derniers chercheurs ont utilisé une pince à biopsie qui prélève un morceau de tissu très grand par rapport à celles utilisées dans les autres études.

3.5. Cytologie

3.5.1. Principe

Bien qu'il existe plusieurs méthodes de prélèvement de la cytologie utérine, à savoir la cytobrosse, l'écouvillonnage, le lavage utérin et le cytotape, la cytologie utérine par cytobrosse reste la méthode la plus fiable pour le diagnostic des endométrites chez la vache laitière [3, 15, 41].

La cytologie utérine représente une technique de diagnostic des infections utérines notamment pour la forme subclinique où aucun signe clinique n'est possible à mettre en évidence [14]. Cet examen consiste à recueillir, à l'aide d'un dispositif bien adapté, un

prélèvement cellulaire dont le but est de mettre en évidence la réaction inflammatoire au niveau de l'endomètre [40].

3.5.2. Matériels

Après avoir assuré une bonne contention, la région périnéale doit être vigoureusement nettoyée à l'aide du povidone iodé et séchée avec du papier absorbant. Ensuite le rectum de la vache doit être vidé de ses matières fécales à l'aide d'une main gantée [52].

Une cytobrosse stérile à usage humain est adaptée pour qu'elle soit compatible pour la vache (cf. Figure 5). Le bras de la cytobrosse est coupé à 8 cm et attachée dans le creux du pistolet d'insémination artificielle [40, 86]. L'ensemble est protégé par une gaine plastique d'insémination afin de rigidifier le dispositif et éviter sa contamination au moment du passage dans le vagin [15]. Parfois le dispositif est encore protégé par une chemise sanitaire pour minimiser la contamination vaginale du dispositif et surtout pour éviter le transport des bactéries du vagin à l'utérus [52].

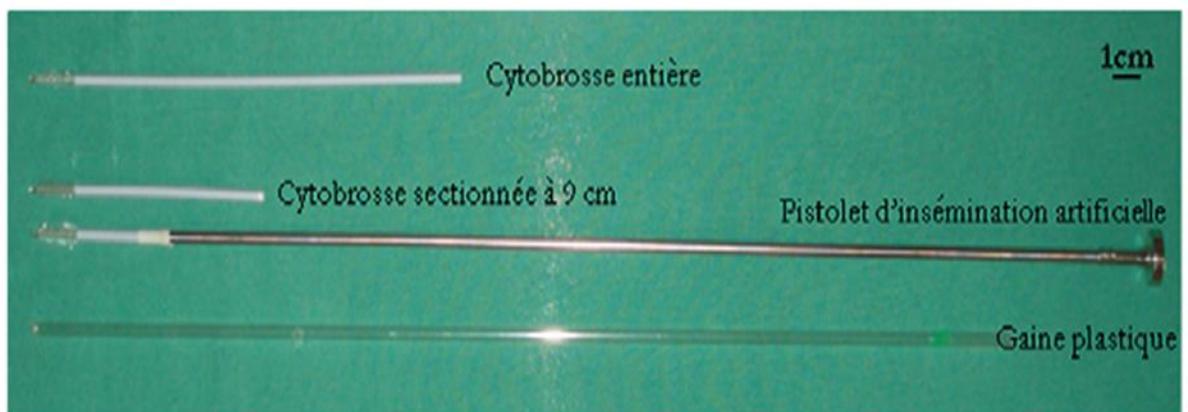


Figure 5 : Montage de la cytobrosse sur le pistolet d'insémination artificielle pour le prélèvement cytologique [52].

3.5.3. Mise en œuvre

A l'aide d'une main gantée le dispositif est introduit dans le vagin et au moment de la traversé du col de l'utérus la chemise sanitaire est immédiatement retirée. A l'aide d'une main gantée introduite dans le rectum on assure le guidage du dispositif par l'immobilisation du col utérin. Une fois le col de l'utérus est traversé par le dispositif, la gaine est retirée légèrement vers l'arrière pour faire exposer la cytobrosse. Par mouvement de rotation, la cytobrosse est roulé sur l'endomètre pour récolter le maximum de cellules. La cytobrosse est par la suite

réintroduite dans la gaine de plastique et le dispositif fait sortir de l'utérus [15, 42]. Il est conseillé de stériliser le dispositif de prélèvement à la vapeur pendant 4 minutes après chaque utilisation [40].

A. Préparation des frottis

Au pied de la vache, la cytobrosse est ensuite retirée du pistolet d'insémination est alors roulée sur une lame microscopique. Le frottis est ensuite soit laissé séché par l'air soit en utilisant un cyto-fixateur pour garder la bonne intégrité des cellules [15, 86]. Les frottis sont ensuite colorées à l'aide de coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) afin de faciliter la différenciation entre les cellules inflammatoires [42, 52].

B. Lecture des frottis

Après coloration les frottis sont ensuite observer sous microscope optique à x400. Un minimum de 200 cellules est compté et le pourcentage des polynucléaires neutrophiles (PNN ou PMN) est calculé pour chaque lame. Les cellules calculées sont les polynucléaires neutrophiles (PNN), polynucléaires éosinophiles (PNE), polynucléaires basophiles (PNB), lymphocytes, monocytes/macrophages et cellules épithéliales (granulaires et aglandulaires) (Cf. Figure 7) [52].

3.5.4. Critère et intérêts du diagnostic

Selon Gilbert et al. [3] et Kasimanickam et al. [40] il y a une relation significativement positive entre le pourcentage de PMN dans l'utérus et son état inflammatoire. Le seuil de positivité ou le pourcentage à partir duquel il devient possible de différencier les vaches atteintes d'endométrites des vaches indemnes varie d'une étude à une autre et selon la technique utilisée et la période de diagnostic (Cf. Tableau 6).

Bien que la variation de taux de neutrophiles en fonction de la phase de cycle œstral soit souvent un sujet de débat entre les auteurs, plusieurs chercheurs ont conclu que la cytologie utérine peut être faite à n'importe quel moment sans que le résultat de ce dernier soit modifié par la phase de cyclicité de la vache [15, 86-88]. La cytologie utérine à l'aide d'une cytobrosse représente la meilleure technique de diagnostic des endométrites notamment la forme subclinique car elle est rapide, facile et sans risque pour la santé de la vache [15, 41, 89].

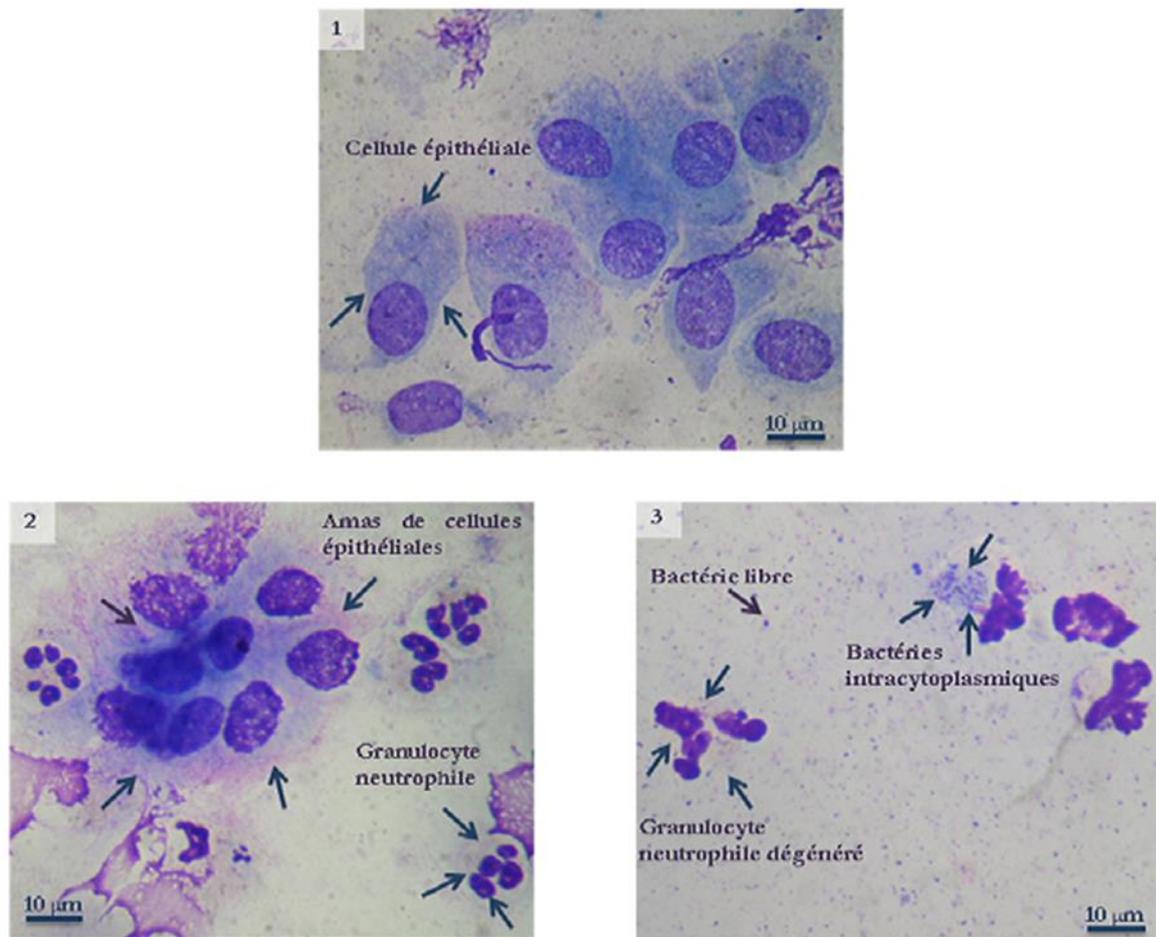


Figure 6 : Frottis cytologiques endométriaux (grossissement 1000X, coloration May-Grünwald Giemsa) [42]. Les flèches délimitent les contours des cellules d'intérêt. 1. Cellules épithéliales, 2. Granulocytes neutrophiles infiltrés dans l'endomètre utérin (amas de cellules épithéliales), 3. Granulocytes neutrophiles dégénérés après phagocytose (bactéries intracytoplasmiques) et présence de bactéries libres sur le fond de la lame.

Tableau 6 : Seuils de positivité adoptés pour définir les endométrites chez la vache laitière.

Date d'examen (JPP)	Seuil (%PMN)	Prévalence %	Technique de recueil	Référence
42	6	48,7		[90]
20 - 33	18	35,10		[40]
34 - 47	10	34		[52]
21 - 60	5	26		[91]
32 - 70	5	26		[92]
25 ± 3	5	23,5		[93]
20 - 30	5	22		
21 - 33	8	21,5	Cytobrosse	
34 - 47	6	16		[86]
48 - 62	4	16		
32 - 38	6	19,3		
53 - 59	4	13,8		[28]
271 ± 117	5	12,7		[94]
31 - 38	6	12		[95]
46 - 53	4	17		
28 - 41	8	11,10		[41]
21	8,5	66,7		
35	6,50	38,2		[96]
49	4	37,2	Lavage utérin	
40 - 60	5	53		[3]
40 - 60	10	25,9		[17]
35 ± 3	18	-		[58]
29 - 36	5	-	Écouvillon	[97]

3.6. Bactériologie

3.6.1. Principe

L'examen microbiologique permet l'isolement et l'identification directe des bactéries incriminées dans l'infection endométriale. Pour faire un prélèvement fidèlement interprétable il faut assurer des bonnes conditions d'asepsie.

3.6.2. Matériels

A. Matériel de préparation de la vache

Du fait qu'un prélèvement microbiologique aseptique prend beaucoup de temps, il faut alors assurer une bonne contention de la vache. L'idéal est de mettre l'animal dans un travail de contention. On précède ensuite à un bon nettoyage de la région pelvienne notamment la

vulve avec de la povidone iodé ou de l'eau savonneuse. La vulve est ensuite séchée avec un papier absorbant.

B. Matériel de prélèvement microbiologique

Il existe plusieurs dispositifs de prélèvements en vue de diagnostic bactériologique des endométrites chez la vache, en l'occurrence la cytobrosse, écouvillonnage, lavage utérin et la pince à biopsie [15, 98, 99].

3.6.3. Mise en œuvre

A. Prélèvement par écouvillonnage

Il existe des écouvillons spécifiques et bien adaptés à l'usage intra-utérin chez la vache en vue de réaliser un prélèvement microbiologique assez aseptique. Outre cet écouvillon spécifique on peut faire un dispositif par un pistolet d'insémination sur lequel on fixe un écouvillon normal [98]. Après écartement des lèvres vulvaires, on introduit un tuyau qui doit être fabriquée avec du plastique souple pour assurer la protection du dispositif de prélèvement. Le pistolet d'insémination est ensuite avancé à travers le tube extérieur dans l'utérus guidé par une palpation rectale. L'écouvillon stérile, qui a été fixé sur le pistolet d'insémination est poussé hors de sa gaine de plastique (pour le protéger de la contamination par le col), et se fait déplacer doucement dans le corps de l'utérus. Après avoir réintroduit dans sa gaine de protection, l'écouvillon est ensuite retiré du vagin, avec un assistant écartant les lèvres de la vulve.

B. Prélèvement par cytobrosse

Le prélèvement microbiologique se fait de la même façon que le prélèvement cytologique avec un bon respect des conditions d'asepsie.

C. Prélèvement par biopsie

Les étapes de prélèvement microbiologique sont identiques à celles de prélèvement en vue de l'étude histologique. Les conditions d'asepsie doivent être respectées au maximum.

D. Transport

La cytobrosse, l'écouvillon, le liquide de lavage ou le morceau de tissu prélevé par biopsie est placé dans un tube en plastique contenant un milieu de transport (Stuart ou thioglucolate). Les tubes sont ensuite transportés sous froid dans une vers le laboratoire de microbiologie dans un délai de 6 heures [15, 98].

E. Culture bactérienne et incubation

Au niveau de laboratoire, la culture microbiologique se fait en aérobie et en anaérobie. Pour la culture en conditions d'aérobie, à l'aide de cytobrosse ou un écouvillon on fait une inoculation par striation sur des boites de pétri contenant de la gélose avec du sang de mouton, Mac Conkey et un bouillon nutritif [98]. Pour la technique de biopsie on met directement le fragment tissulaire sur les boites de pétri. Ces dernières sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures [15].

Pour les conditions anaérobiques, la culture se fait sur des boites de pétri contenant gélose Brucella avec de l'extrait de levure, solution héminique (5mg/kg), la vitamine K (1mg/ml) et du sang hémolysé. Les boites sont ensuite incubées dans une atmosphère anaérobie avec 5% de dioxyde de carbone, 10% d'hydrogène, 85% de nitrogène à 37°C pendant 9 jours [15, 98].

F. Identification

L'identification bactérienne se fait selon les caractéristiques de la colonie, coloration de Gram, morphologie, pouvoir d'hémolyse et enfin les caractéristiques biochimiques selon Winn et al. [100] avec une confirmation par les galeries API® system [15, 98].

3.6.4. Critère et intérêts diagnostiques

Cette technique de diagnostic peut être utilisée pour l'indentification de l'ensemble de bactéries isolées chez la vache sujette de diagnostic d'endométrite, comme elle peut être utilisée pour l'isolement et l'identification d'une bactérie bien ciblée (exemple *E. coli* ou *T. pyogènes*).

Selon Machado et al. [99] en utilisant le lavage utérin comme moyen de prélèvement, ils recommandent pour l'isolement de *T. pyogènes* de faire la culture sur des boites de pétri avec Muller-Hinton supplémenté avec 5% de sang de mouton défibriné. Les boites sont ensuite incubées dans une atmosphère anaérobie avec 7% de CO₂ à 38°C pendant 48 heures. L'identification se fait en se basant sur la morphologie des colonies, le pouvoir hémolytique et la coloration de Gram.

Il semble que cette technique n'est que rarement utilisée sur le terrain et elle est uniquement conservée pour les animaux de valeur du fait qu'elle est longue à mettre en œuvre et très couteuse (entre 40 et 50 euros / vache) [43]. En plus, la présence de la bactérie

au niveau de l'utérus au-delà du 21ème jour du postpartum n'est pas toujours associée à une inflammation endométriale [35, 49].

4. Facteurs de risque des endométrites

Aujourd'hui, il est très clair que l'endométrite est une maladie multifactorielle et plusieurs facteurs influencent directement ou indirectement son installation [19, 20]. Plusieurs études ont été effectuées pour mettre en évidence les facteurs de risque des endométrites et les résultats sont très variables [8, 20-24]. En Algérie, à notre connaissance et jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, nous n'avons trouvé aucune étude sur les facteurs de risque des endométrites.

4.1. Facteurs extrinsèques

4.1.1. Saison du vêlage

Suite à une analyse multivariable, Bruun et al. [101] ont trouvé une relation significative entre le développement des infections utérines, durant les 30 premiers jours postpartum, et la saison du vêlage (Cf. Tableau 7). Bien qu'il ne fût pas possible de distinguer la forme clinique de l'endométrite, cette étude a démontré qu'un vêlage survenu entre le mois de novembre et le mois d'avril, dans le pays de Danemark, augmente significativement l'incidence des infections utérines durant le premier mois du postpartum. L'augmentation serait due à la détérioration de l'état général de la vache durant cette période (l'hiver), ce qui la rend vulnérable aux infections utérines [2, 102, 103].

Ghavi Hossein-Zadeh et Ardalán [23] en travaillant sur 57 301 vaches laitières ont confirmé qu'un vêlage durant la saison de l'hiver augmente directement le risque de développer une métrite clinique avec un Odds-ratio de 2.4 (OR : 2.4). Indirectement, le vêlage en hiver augmente le risque de développer une métrite alors que cette dernière est considérée comme l'un des facteurs de risque les importants qui favorise l'installation des endométrites [23, 104].

En revanche, Kim et Kang [19] et Carneiro et al. [91] ont trouvé que la saison du vêlage n'affecte pas l'incidence de l'endométrite clinique dans la Corée, et l'endométrite subclinique dans le Brésil, respectivement (Cf. Tableau 7). Cette différence de constatations serait due

d'un côté aux critères de diagnostic et d'autre coté à la variation des conditions climatiques entre les différents pays.

Tableau 7 : Répartition des vaches en fonction de l'état inflammatoire de l'utérus selon la saison du vêlage.

Variables	Saison	Nombre de vaches			
		Endométrite positive		Endométrite négative	
		[19]	[101]	[19]	[101]
Saison de vêlage	Été	31	264	56	40092
	Automne	31		64	
	Hiver	32	469	39	61235
	Printemps	17		42	

4.1.2. Alimentation

a) Protéines

Du fait que les anticorps sont des protéines, leur synthèse dans le cas d'une infection utérine, nécessite la disponibilité de tous les acides aminés notamment la lysine, le tryptophane, la thréonine et la leucine. Ce qui veut dire que la quantité et même la qualité des protéines dans la ration alimentaire jouent un rôle majeur dans l'efficacité du système immunitaire pour moduler une réaction inflammatoire adéquate a une involution utérine complète et lutter contre une éventuelle infection utérine [105].

L'immunité cellulaire est entre outre affectée par la quantité des protéines dans la ration, car il a été démontré qu'une carence en protéines dans l'organisme diminue fortement le nombre de cellules phagocytaires et affecte leur faculté de mobilité vers le lieu de l'infection pour dégrader l'agent pathogène [39].

En revanche, l'excès de protéine dans la ration provoque une augmentation de taux d'ammoniac sérique, ce qui diminue la production des lymphocytes et favorise le développement des endométrites cliniques [106].

b) Vitamines

Étant impliquée dans l'intégrité et la régénération tissulaire, la vitamine A joue un rôle major dans l'involution utérine notamment dans la réparation de l'endomètre en cas de

lésions ou de blessures suite à un vêlage dystocique. De plus, la vitamine A entre dans la composition du lysosome et du système de complément et sa carence est à l'origine d'un défaut de migration des macrophages de la circulation sanguine vers l'utérus ce qui rend ce dernier un milieu favorable pour la multiplication des microbes [105].

Plusieurs d'autres vitamines interviennent dans le fonctionnement du système immunitaire, telles que les vitamines B et C qui entrent dans la synthèse des anticorps. La vitamine E, en plus de son effet antioxydant comme la vitamine C, elle assure la bonne intégrité des cellules du système immunitaire et les protège contre les radicaux libres [107]. De ce fait, les carences des antioxydants contribuent à une inflammation prolongée et sévère via l'activation de la voie de NF- κ B et une forte production de TNF (Tumor Necrosis Factor) qui assure une forte insulino-résistance, ce qui aggrave le déficit énergétique [108, 109].

c) Minéraux

Le calcium intervient dans l'activation du complément, et sa carence provoque un retard de l'involution utérine et prolonge la durée d'une infection endométriale. Sa carence est parfois provoquée par l'excès du phosphore ce qui ralentit significativement la durée de l'involution utérine [110]. Le magnésium intervient dans les mécanismes d'opsonisation [105].

Un apport suffisant du sélénium augmente la capacité bactéricide des PMN [111]. Le cuivre, zinc et fer intervient dans la formation du lysosome et leurs carences diminuent la capacité phagocytaire des cellules immunitaires et favorisent la multiplication des bactéries responsables aux endométrites cliniques et subcliniques [105, 110].

4.2. Facteurs intrinsèques

4.2.1. Rang de lactation

Les avis des auteurs sur l'influence de l'âge ou le rang de lactation sur les infections utérines, notamment les endométrites sont controversées. Pour Chaffaux et al. [112] et Francoz [113], cette influence n'est significative que chez les vaches ayant vêlées au moins cinq fois et chez les primipares. Par le fait que la primipare est souvent sujette d'un vêlage dystocique, les lésions endométriales et l'endométrite clinique sont très fréquentes et plus prolongées [20, 101] et la persistance de cette infection est en relation avec le degré de lésions

de l'utérus. Suite à une perte de l'élasticité du tissu utérin chez les vaches plus âgées, l'involution utérine prend plus de temps, ce qui rend la vache vulnérable à une inflammation utérine persistante sous forme d'endométrite, avec des dégâts plus remarquables que chez les vaches moins âgées.

Une autre explication immunologique permet de faire comprendre cette constatation. Les multipares étaient à chaque vêlage en confrontation avec des contaminations bactériennes de l'utérus et mobilisation du système immunitaire humorale et cellulaire. De cette façon la vache a développé certaine résistance contre les infections utérines ce qui assure une élimination plus rapide des bactéries. Le contraire pour les primipares dont le système immunitaire n'a pas encore rencontré ce type d'infections, et la primipares développe des infections utérines sévères qui durent dans le temps sous forme d'endométrite clinique ou même subclinique [112]. Potter et al. [20] ont trouvé que les primipares ont plus de chance de développer une endométrite clinique avec OR : 2.3 (P<0.01).

Kadivar et al. [114], Ben David [115] et Kim et Kang [19] ont observé l'inverse, l'inflammation utérine persistante et l'endométrite clinique sont moins fréquentes chez les primipares que les multipares, à cause de l'involution utérine très rapide chez les premières. Cependant, Giuliadori et al. [116] et Thibier et Steffan [117], ont écarté l'influence de l'âge et le nombre de parité sur la prévalence de l'endométrite clinique. Carneiro et al. [91] ont prouvé aussi que la parité n'affecte pas l'incidence de l'endométrite subclinique.

4.2.2. Dystocie

Chez la vache un vêlage dystocique est souvent associé à de multiples complications postpartum notamment la rétention placentaire et le retard de l'involution utérine, ce qui favorisent sans doute l'apparition des endométrites [2, 118, 119].

Selon Bruun et al. [101], un vêlage dystocique est considéré comme un facteur de risque qui influence l'incidence des endométrites de façon significative. Cette équipe de recherche a fait l'analyse de données de 102 060 vaches laitières et a trouvé qu'il y a une relation significative entre le vêlage dystocique et le risque de développer une métrite ou endométrite clinique durant les 30 premiers jours postpartum avec OR : 3 (intervalle de confiance (IC) : 2.3-4, P< 0,001). Giuliadori et al. [116] ont confirmé la corrélation entre un vêlage dystocique et

l'endométrite clinique avec un OR ajusté (AOR) de 2.2. De plus, la dystocie augmente indirectement les chances de développer une endométrite par l'augmentation du risque d'apparition de métrite avec OR : 4.3 (IC : 3.74–4.92, P<0.001) [23].

Un vêlage dystocique provoque un traumatisme et lésions au niveau de l'utérus de la vache, et les interventions par assistance de vêlage favorise l'introduction des germes et par conséquent augmente le risque d'apparition d'endométrite [101]. Potter et al. [20] ont constaté que l'assistance de vêlage est considérée comme un facteur de risque pour l'endométrite clinique avec OR :2.1 (IC : 1.0-4.4, P> 0,05).

Le sexe mâle du veau favorise la dystocie et augmente le risque d'endométrite notamment l'endométrite clinique [104]. Du fait que le veau male est plus volumineux que la femelle, sa naissance est souvent associée à un vêlage dystocique. Potter et al. [20] ont constaté que, suite à une étude réalisée sur 293 vaches laitières, le vêlage d'un veau de sexe male est considéré comme un facteur de risque significativement associé aux endométrites cliniques avec un risque relatif (RR : 1.5). Les mêmes auteurs suggèrent que, dans l'élevage concerné par l'étude, il était possible de réduire de 60% le taux des endométrites si tous les veaux nés étaient de sexe femelle. Ghavi Hossein-Zadeh et Ardalán [23] confirme cette relation avec OR : 2.41.

Potter et al. [20] expliquent cette relation par le fait que le volume important du veau male, d'un côté provoque un traumatisme au niveau de l'appareil génital femelle de la vache et d'autre coté nécessite une assistance de vêlage ce qui augmente le risque de contamination de l'utérus et le développement d'une endométrite persistante.

4.2.3. Rétention placentaire

La rétention placentaire est définie par un défaut d'élimination des membranes foétales 24h après le part [19]. La non délivrance ou la rétention placentaire représente le facteur de risque le plus important pour le développement de l'endométrite chez la vache laitière [16, 19, 20]. Hossein-Zadeh et Ardalán [23] et Potter et al. [20] confirment cette relation de causalité dans le cas de métrite et endométrite clinique avec un OR : 27.7 et 40.3, respectivement.

Les vaches atteintes d'endométrites présentent une forte concentration plasmatique de LPS bactérien, un immunodépresseur très puissant qui diminue le recrutement des leucocytes vers l'utérus pour faire face aux infections utérines et moduler la réaction inflammatoire du postpartum [26, 120]. Salasel et al. [8] ont rapporté une corrélation positive entre la rétention placentaire et l'endométrite subclinique suite à la détérioration des fonctions des neutrophiles.

Les tissus résiduels rencontrés lors de rétention placentaire représentent un milieu favorable pour le développement des germes et le tissu nécrotique retarde l'involution utérine et la régénération de l'endomètre. En plus les tissus résiduels maintiennent le cervix ouvert, qui normalement représente une barrière physique pour les infections utérines chez les vaches saines [19, 20].

Du fait qu'ils constituent des facteurs de risque de la rétention placentaire, la durée de gestation, induction de vêlage, gémellité et mortinatalité augmentent la prévalence des endométrites cliniques et subcliniques en favorisant la non délivrance. Ghavi Hossein-zadeh et Ardalan [23] ont constaté que les vaches avec une gestation courte (<270 jours) sont presque 4 fois plus exposées au problème de rétention placentaire que les vaches à gestation de durée normale (270-280 jours) (OR = 3.8).

Dans une étude réalisée par Markusfeld [2] sur 2017 vêlages répartis sur une année, a conclu que les génisses ayant une gestation longue (>270 jours) ont un risque relativement plus élevé de développer des métrites et endométrites cliniques en comparaison à celles ayant une gestation de durée normale. Il pense également que les vaches ayant une gestation courte ont plus de risque de rétention placentaire que celles à gestation plus longue [20, 121, 122].

L'induction de vêlage influence l'incidence des infections utérines soit directement soit indirectement par l'augmentation de risque d'atteinte par les mammites, maladies métaboliques, rétention placentaire ou de mortinatalité [122-126]. Selon Benedictus et al. [127] l'induction de vêlage par un anti-inflammatoire stéroïdien, la Dexaméthasone, provoque une défaillance dans l'activité du système immunitaire notamment le chimiotactisme et la phagocytose à l'origine d'un problème de désengrènement des cotylédons et de rétention placentaire et qui sera compliqué par la suite par une endométrite.

Depuis longtemps, la gémellité est considérée comme un facteur de risque pour les infections utérines et elle peut augmenter indirectement la prévalence de l'endométrite clinique et subclinique en favorisant le développement d'autres pathologies qui sont considérées comme des facteurs de risque major pour l'endométrite [104]. Selon Muller et Owens [128], l'incidence de la rétention placentaire était plus importante chez les vaches ayant eu des jumeaux (35,7%) que chez les vaches ayant eu un seul veau (7,7%). Potter et al. [20] confirment cette observation et déclarent que le vêlage des jumeaux était significativement associé à une rétention placentaire.

Ghavi Hossein-zadeh et Ardalán [23] ont démontré que les vaches qui ont eu des jumeaux ont 6 fois plus de chance de développer une métrite (OR : 6.6) et 3 fois plus de chance de développer une rétention placentaire (OR : 2.8). Dubuc et al. [129] confirment cette observation et expliquent que les jumeaux et la dystocie et le traumatisme qui en résultent augmentent la contamination bactérienne de l'utérus et amplifient le risque de rétention placentaire et métrite qui peut être prolongée sous forme d'endométrite [130].

En revanche, Prunner et al. [33] ont trouvé que la prévalence de l'endométrite clinique n'est pas significativement influencée par le vêlage des jumeaux, et selon ces auteurs le petit nombre de jumeaux (n=18/400) enregistré dans cette étude peut expliquer la corrélation non-significative.

La relation entre l'endométrite et la naissance des jumeaux peut être expliquée par le fait que cette dernière est souvent associée à un traumatisme vaginal et/ou utérin [20]. D'autre côté, Laven et Peters [131] suggèrent que le raccourcissement de la durée de gestation enregistré dans le cas de gémellité favorise l'installation de la rétention placentaire et la complication par endométrite.

Depuis longtemps, Markusfeld [2] a pu mettre évidence la relation entre les infections utérines et la naissance d'un veau mort, en expliquant que la vache qui vêlent un veau mort-né est souvent un sujet de rétention placentaire et de métrite. Selon Laven et Peters [131], le défaut de maturation placentaire suite au raccourcissement de la durée de gestation en cas de vêlage d'un veau mort est probablement à l'origine d'une rétention placentaire et d'une endométrite.

Le risque relatif de la naissance d'un veau mort sur l'incidence des endométrites clinique est de RR : 3.1 [20] et OR : 6.3 [23]. Les mêmes auteurs ont trouvé que la naissance de veau mort est surtout rencontrée chez les génisses, probablement à cause de la petite taille de la cavité pelvienne.

4.2.4. Métrite

Les métrites et les endométrites étaient considérées souvent comme une seule entité [101, 118]. Aujourd'hui il est devenu indispensable de faire la distinction entre les deux types de pathologies utérines [14, 26]. Du fait que la réaction inflammatoire et la contamination microbienne de l'appareil génitale femelle de la vache au moment de vêlage sont inévitables, la majorité des vaches expriment des signes d'une métrite clinique et parfois même une métrite puerpérale durant les deux semaines suivants le part [12, 14]. Selon les mêmes auteurs le système immunitaire de la vache intervient pour éliminer la majorité des bactéries de l'utérus mais un nombre important des vaches restent porteuses des bactéries dans leurs tractus génitaux au-delà de la troisième semaine postpartum, à l'origine d'une endométrite clinique ou subclinique.

Dubuc et al. [129] ont constaté que les vaches qui avaient présenté une métrite juste après le vêlage avaient plus de chance d'être atteintes par les endométrites avec un OR : 2.3. Cheong et al. [17] confirment que la métrite est considérée comme un facteur de risque pour les endométrites clinique avec OR : 1.9 (95% IC : 1.0–3.3). Il semble qu'il y a une relation positive entre la gravité des signes cliniques de la métrite et le risque de développement d'une endométrite chez la même vache. Giuliadori et al. [116], en travaillant sur 303 vaches laitières, ont constaté que les femelles qui avaient une métrite puerpérale juste après le part avaient plus de chance de développer une endométrite (OR : 2.1) que celles qui avaient une métrite clinique (OR : 1.4).

Du fait que relation entre la métrite et l'endométrite est très significative, tous les facteurs de risque qui favorisent l'installation d'une métrite juste après le part, favorisent indirectement le développement d'une endométrite chez la même vache. Hossein-Zadeh et Ardalan [23] ont trouvé que la dystocie (OR : 4.3), la mortinatalité (OR : 6.2), la rétention placentaire (OR : 27.7), la naissance de jumeaux (OR : 6.6), la primiparité (OR : 1.7), le vêlage

durant l'hiver (OR : 2.4) et la naissance d'un veau male (OR : 2.4) influencent significativement le développement d'une métrite.

4.2.5. Hypocalcémie

Suite à une forte mobilisation du calcium chez la vache aux alentours du vêlage, l'hypocalcémie est donc un problème très fréquent durant cette période. Il semble que l'hypocalcémie non seulement augmente le risque de l'installation d'une endométrite mais elle augmente aussi sa sévérité [132].

Le calcium est un élément très important dans le processus de l'involution utérine et son manque le retarde pour plusieurs jours et favorise ainsi l'infection utérine et le développement d'une endométrite [133]. De ce fait, la fièvre vitulaire ou l'hypocalcémie est considérée comme un facteur de risque pour l'installation de la rétention placentaire avec OR : 3.7 et favorise le développement d'une métrite et/ou endométrite [23]. Selon Kim et Kang [19], les problèmes métabolique y a compris l'hypocalcémie influencent significativement l'incidence des endométrites cliniques avec OR : 3.5 (95% IC : 1.1-10.8, P= 0.03).

Roche [134] et Guterbock [135] confirment que l'hypocalcémie affaibli l'activité contractile de l'utérus, provoque la dystocie, prolonge la durée de gestation et augmente le risque de développement d'une rétention placentaire et endométrite. De plus, l'hypocalcémie subclinique diminue l'activité du rumen, conduisant à une réduction de capacité d'ingestion et augmentation du risque de cétose et déplacement de la caillette [21].

Bien que l'effet dépressif de l'hypocalcémie sur les contractions du rumen et sa relation avec le déplacement de la caillette soit bien étudié, l'effet du déplacement de la caillette sur l'incidence des endométrites n'est pas encore bien détaillé [21, 135] (Cf. Tableau 8). Parmi les rares études qui ont traité ce sujet, Curtis et al. [136] et Markusfeld et al. [137] ont reporté une corrélation significative entre le déplacement de la caillette et l'endométrite clinique avec OR : 3.6 et 4.7, respectivement. En revanche, il n'était pas possible de distinguer l'endométrite clinique de la métrite clinique car les auteurs ont diagnostiqué les vaches avec écoulement vaginal purulent durant le premier mois postpartum et ils ont considéré les deux pathologies comme une seule entité.

Kim et Kang [19], en étudiant l'effet des maladies métaboliques sur le développement d'une endométrite clinique ont trouvé que les problèmes métaboliques (déplacement de la caillette, hypocalcémie et la cétose, tous confondus) affectent significativement la prévalence des endométrites cliniques chez la vache laitière ($P < 0.03$). Ces auteurs ont englobé les trois maladies métaboliques comme un seul facteur de risque, ce qui rend l'interprétation de la corrélation entre le déplacement de la caillette et l'incidence des endométrites cliniques assez compliqué.

Bien qu'il semble que les problèmes métaboliques influencent de façon significative le taux d'apparition de la rétention placentaire, et cette dernière est considérée comme un facteur de risque qui augmente l'incidence des endométrites, Cheong et al. [17] ont trouvé que cette corrélation n'est pas toujours significative.

4.2.6. Mammite

La mammite représente chez la vache un réservoir de bactéries qui peuvent contaminer l'étable, le matériel de l'élevage et de la traite et même de l'utérus de la vache à l'origine de l'apparition des endométrites. Selon plusieurs auteurs, les bactéries responsables aux infections utérines sont des bactéries non spécifiques, souvent d'origine environnementale et qui contaminent l'utérus au moment du vêlage [15, 138].

Indirectement, les facteurs de risque des mammites sont à certain degré considéré comme des facteurs qui favorisent indirectement l'apparition des endométrites chez la vache laitière du fait que la mammite aigüe soit un facteur de risque d'une métrite puerpérale/clinique. Parmi ces facteurs on trouve la rétention placentaire (OR=9.4), l'hypocalcémie (OR=12.4), la multiparité (OR=2.8) et le vêlage en hiver (OR=1.7) [23]. La mammite subclinique influence directement et de façon significative l'incidence des endométrites cliniques au 30^{ème} JPP (OR : 4.5) et 60^{ème} JPP (OR : 3.6) [24]. En revanche, bien que l'Odds-ratio des mammites sur les endométrites cliniques soit supérieure à 1, parfois cette relation n'est pas vraiment significative du point de vue statistique [20].

4.2.7. Balance énergétique négative

La balance énergétique négative (BEN) est souvent associée à une inflammation endométriale sévère et durable ce qui retarde l'involution utérine et affect l'activité de

destruction des bactéries par les phagocytes après leur ingestion [139-141]. La BEN favorise le développement de nombreux troubles métaboliques, en particulier la cétose, qui a son tour favorise les principaux facteurs de l'endométrite à savoir la rétention placentaire et la métrite par 6.1 à 9.5 fois, respectivement [137].

Suthar et al. [142] ont démontré que la cétose subclinique est considérée comme une passerelle pour plusieurs d'autres problèmes métaboliques comme la cétose clinique et le déplacement de la caillette, et problèmes infectieux comme la métrite et la mammité. Au début de lactation, la vache nécessite une quantité très importante de glucose pour produire du lactose, sucre du lait, et ces besoins sont au maximum dès la troisième semaine du postpartum. Durant cette période, la vache se confronte à un faible appétit qui ne peut pas répondre aux besoins énergétiques requis pour assurer les métabolismes nécessaires. Ce déficit énergétique provoque une mobilisation importante des réserves graisseuses. Leur dégradation produit une grande quantité de corps cétoniques, utilisés comme source d'énergie en présence du glucose. Si l'organisme ne dispose pas d'assez de glucose, les corps cétoniques s'accumulent dans le sang à des concentrations toxiques à l'origine de la cétose [120, 143-145].

Dans une étude réalisée in-vitro, Sartorelli et al. [146] ont démontré qu'une forte accumulation de corps cétonique dans le plasma des ovins affecte négativement et de façon significative l'activité du système immunitaire non-spécifique, notamment l'activité phagocytaire et chimiotactique des neutrophiles. Selon Kim and Kang [19], les problèmes métaboliques y compris la cétose affectent significativement la prévalence des endométrites cliniques (Cf. Tableau 8). Cheong et al. [17], en travaillant sur 779 vaches laitières ont trouvé que la cétose augmente le risque de l'endométrite subclinique avec OR : 3.8 (95 IC : 1.8-8.1).

Du fait que la BEN est très fréquente durant le postpartum, les vaches laitières haute productrices sont plus sensibles aux effets de la BEN et plus vulnérable aux endométrites [2, 17]. Puisque la période postpartum est caractérisée par une faible capacité d'ingestion, BEN et une forte lipo-mobilisation, les problèmes métaboliques et la stéatose hépatique sont très fréquents durant cette période, ce qui réduit de façon dramatique l'efficacité du système immunitaire [139, 145]. En ajoutant les modifications anatomiques, histologiques et cytologiques de l'utérus et l'appareil génital en général, la vache se trouve directement en

challenge avec une large variété de microbes qui contaminent et colonisent l'utérus en provoquant des endométrites durables [120].

Selon Chaffaux et al. [112], il semble que la forte production laitière diminue la prévalence des endométrites cliniques. Dans le même contexte, Giuliadori et al. [116] ont trouvé que les vaches avec endométrite clinique produisaient plus de lait que les vaches indemnes d'endométrite clinique (27.8 ± 0.9 contre 25.7 ± 0.4 kg/jour, $P = 0.04$). Pour la forme subclinique, Cheong et al. [17] ont constaté que l'augmentation de la production laitière augmente le risque de l'endométrite subclinique chez les vaches primipares mais elle le diminue chez les multipares.

On comprend donc que la prévalence des endométrites n'est pas directement influencée par le niveau de la production laitière de la vache, car l'endométrite et la production laitière résultent de l'interaction entre plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que l'âge, l'alimentation, la race, la santé, l'état d'engraissement et le potentiel génétique de chaque vache.

Une vache trop maigre ou obèse est toujours sujette à un vêlage dystocique, allongement de la durée de gestation, rétention placentaire et affections utérines, ce qui se prolongent dans le temps sous forme d'endométrite [109, 147, 148]. Comme dans le cas de cétose, après le vêlage, la vache se trouve toujours en face à une BEN et pour faire face, la vache doit utiliser ses réserves corporelles, c'est la lipo-mobilisation. La forte lipo-mobilisation entraîne une accumulation très importante des acides gras non estérifiés (AGNE) ce qui augmente les chances de développement d'endométrite dans 80% des cas, et contribue directement à une forte réaction inflammatoire par leurs fixations avec les Toll-Like Receptor 4 (TLR4) et le déclenchement d'une cascade inflammatoire via les facteurs de nécrose tumorales TNF [109, 149, 150]. Giuliadori et al. [116] ont trouvé qu'une forte accumulation des AGNE durant postpartum augmente le risque d'endométrite clinique avec Odds-ratio ajusté de 1.003 ($P < 0.05$).

L'accumulation des AGNE provoque une stéatose hépatique qui diminue, indirectement, l'activité des neutrophiles notamment la phagocytose [141, 151]. La diminution de la capacité d'ingestion, la BEN ainsi que la lipo-mobilisation contribuent activement dans le degré et la

durée de la défaillance du système immunitaire très fréquente de la 2^{ème} semaine avant le part jusqu'à la 3^{ème} semaine après le part [139].

Il semble que les vaches atteintes d'endométrite clinique ont souvent un score corporel (BCS) faible par rapport aux vaches indemnes d'endométrite que ce soit durant la période prepartum ou postpartum ($P < 0.05$). De plus, une perte de la note d'état corporel, entre 1 et 1,5 point entre 1 mois avant le vêlage et 1 mois après le part est souvent accompagnée a une forte prévalence des endométrites clinique [19]. Cette forte prévalence est due surtout à l'échec de l'élimination de toxines bactériennes par le foie, suite à une stéatose hépatique lors d'une forte lipo-mobilisation [134, 149].

L'influence de l'état d'embonpoint de la vache sur la prévalence des endométrites subclinique a été aussi confirmée par plusieurs auteurs. Carneiro et al. [91] et Bacha et Regassa [24] ont trouvé que les vaches avec BCS ≤ 2.5 au 30^{ème} JPP avaient une prévalence d'endométrite subclinique significativement plus élevée que les autres vaches, avec un OR :4.5. Du fait que la BEN est inévitable aux alentours du vêlage, les éleveurs essayent souvent de corriger ce problème en augmentant la quantité du concentré distribué dans la ration ce qui augmente le risque d'acidose [109]. La chute de PH du rumen en cas d'acidose favorise la multiplication des bactéries pathogènes ainsi que les productions des endotoxines bactériennes en l'occurrence les lipopolysaccharides (LPS). La propriété pro-inflammatoire des LSP est à l'origine de déclenchement de la réaction inflammatoire au niveau de l'utérus et augmente le risque de l'endométrite tout en diminuant la capacité d'ingestion, ce qui aggrave la BEN et diminue l'efficacité du système immunitaire à éliminer les bactéries de l'utérus [109, 152].

4.2.8. Cyclicité

La reprise de l'activité ovarienne après le part influence significativement la durée de l'involution utérine et par conséquent la chance de développement d'une endométrite clinique ou même subclinique. Suite à une ovulation précoce après le part, le corps jaune (CJ) formé est d'une durée de vie très courte car il est de petite taille, en plus l'endomètre sécrète avec une grande concentration l'hormone lutéolytique PGF2 α . Les vaches qui deviennent rapidement cyclées après le part sont moins prédisposées aux endométrites durant les 30 jours qui suivent le vêlage par rapport aux vaches avec un retard de cyclicité [50, 117, 153].

En revanche, dans le cas d'une endométrite induite par des bactéries Gram négatif comme *E. coli*, les LPS inhibent la sécrétion des GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) ainsi que l'hormone de lutéinisation LH (Luteinizing Hormon), sans affecter la section de l'hormone de croissance folliculaire FSH (Follicle-Stimulating Hormon), bien que les LPS suppriment la sensibilité de l'hypophyse au GnRH [26]. De ce fait, il peut y avoir des croissances folliculaires mais le follicule dominant n'est pas souvent ovulatoire, autrement ça va donner un CJ persistant suite à un défaut de synthèse de PGF2 α ce qui assure une sécrétion continue de la progestérone, une hormone connue pour ces effets immunodépressifs notamment en ce qui concerne le recrutement des cellules immunitaires en l'occurrence les phagocytes [26, 153].

La vache avec une cyclicité précoce juste après le part est moins prédisposée à une endométrite durant les 30 premiers jours postpartum par rapport aux vaches avec une cyclicité retardée [117, 153]. Thibier et steffan [117] ont démontré que les vaches cyclées ont moins d'une chance sur trois (1/3) de souffrir de métrites alors qu'une vache non cyclée a près d'un risque sur deux (1/2) qu'elle soit atteinte de cette affection ($P < 0.01$). La reprise de l'activité ovarienne représente un facteur favorable pour la guérison spontanée des infections utérines, parce que les mécanismes de défense de l'utérus sont stimulés par la concentration élevée de l'œstrogène durant l'œstrus [102]. De plus, cette hormone renforce l'activité phagocytaire avec augmentation de la numération cellulaire au niveau de l'utérus notamment la proportion des neutrophiles, du fait que l'œstrogène augmente la perméabilité vasculaire et favorise la migration des leucocytes de la circulation sanguine systémique vers la lumière de l'utérus. Le mucus cervical représente une barrière physique naturelle qui protège l'utérus contre la contamination bactérienne et l'œstrogène renforce son efficacité en augmentant son volume et en améliorant sa qualité [102, 154]. D'autre coté certains auteurs pense qu'il n'est pas clair si l'activité ovarienne aurai un effet sur l'incidence des endométrites [140, 155].

Tableau 8 : Récapitulatif des facteurs de risque qui influencent l'incidence des endométrites chez la vache laitière (EC : endométrite clinique, ESC : endométrite subclinique, MET : métrite).

Facteur de risque	Auteurs	Nombre de vache	Odds-Ratio	Forme de l'infection utérine	Intervalle de confiance à 95%
Élevage					
	[33]	400	1.1	EC ESC	1.0–1.2
Saison de vêlage					
Printemps			1		
Été	[23]	57 301	0.9	MET	0.8–1.1
Automne			1.1		1.0–1.3
Hiver			2.4		2–2.8
Rang de lactation					
1	[101]	102 060	1	EC et MET*	0.8-1.2
	[20]	293	2.3	EC	1.2-4.4
	[23]	57 301	1.7	MET	1.5–1.8
2			0.6		0.5-0.8
3	[101]	102 060	0.9	EC et MET*	0.7-1.2
>4			1		
Conditions de vêlage					
Dystocie	[136]	1 374	4.9	EC et MET*	1.8-13.8
	[118]	7 761	2.1	EC et MET*	1.6-2.8
	[156]	5 278	1.4	EC et MET*	1-2.1
	[101]	102 060	3	EC et MET*	2.3-4
	[157]	441	2.2	EC	1.1-4.5
	[129]	1 363	2.1	EC	1.4-4
	[20]	293	2.1	EC	1-4.4
	[23]	57 301	4.3	MET	3.7–4.9
	[116]	303	2.2	EC	1.1–4.6
	[137]	8 521	2.9	MET	
Mortinatalité	[118]	7 761	1.5	EC et MET*	1.1-2.1
	[20]	293	7.5	EC	3-18.5
	[23]	57 301	6.3	MET	5.3–7.1
Sexe male du veau	[20]	293	1.8	EC	1-3.3
	[23]	57 301	2.4	MET	2.1–2.7
Avortement	[156]	5 278	2.4	EC et MET*	1-5.9
Gémellité	[137]	8 521	2.3	MET	
	[129]	1 363	2.2	EC	1.1-4.3
	[23]	57 301	6.6	MET	5.3–7.8
Rétention placentaire					
	[136]	1 374	5.7	EC et MET*	3.6-8.8
	[118]	7 761	6	EC et MET*	2.8-7.5

	[156]	5 278	4.7	EC et MET*	3.5-6.5
	[19]	320	5.7	EC	3.1-10.4
	[101]	102 060	Grandes races** 9.9 Jersey 10.8	EC et MET*	6.9–14.1 6.4–18.3
	[158]	135	4.2	EC	1.0–18.1
	[20]	293	40.3	EC	5.0-326.4
	[157]	441	3.9	EC	1.6-7.4
	[23]	57 301	27.7	MET	24.5–30.8
	[32]	40	12.4	EC	1.4-112.7
Mérite					
	[129]	1 363	2.3	EC	1.4–3.8
	[17]	779	1.9	ESC	1.0–3.3
	[116]	303	Clinique : 1.4 Puerpérale : 2.2	EC	0.4–4.3 1.1–4.6
Problèmes métaboliques					
	[19]	320	3.5	EC	1.1-10.8
	[157]	441	2.3	EC	1.1-4.5
	[137]	8 521	2.5	MET	
Cétose	[118]	7 761	1.7	EC and MET*	1-3
	[156]	5 278	1.8	EC and MET*	1.2-2.7
	[101]	102 060	0.5	EC and MET*	0.2-1.3
	[17]	779	3.8	ESC	1.8–8.1
	[137]	8 521	1.8	MET	
Hypocalcémie	[19]	320	3.5	EC	1.1-10.8
Déplacement de la caillette	[136]	1 374	3.6	EC and MET*	1.2-11.6
	[137]	8 521	4.7	MET	1.1-10.8

* : L'endométrite clinique et la mammite ont été considérées comme une seule pathologie.

** : vache de grandes races englobe : Holstein Friesian, Holstein Rouge, Rouge Danoise, autres croisements

5. Impacts des endométrites

L'endométrite représente la pathologie de la reproduction la plus grave et la plus lourde du point de vue économique dans l'élevage laitier. Il est devenu incontestable que les endométrites cliniques affectent les performances de la reproduction de la vache laitière [7, 14]. Des études récentes avaient démontré que l'endométrite clinique et l'endométrite subclinique ont des effets négatifs sur la fertilité qui pourrait être due à la production locale des cytokines et pourrait expliquer l'effet persistant des endométrites sur la fertilité [40, 159].

Les pertes économiques en relation avec l'endométrite sont dues directement aux coûts du traitement de la maladie ainsi que le coût de consultation. Indirectement, les pertes économiques sont en relation avec l'altération des performances de la reproduction

notamment, l'allongement des intervalles vêlage - vêlage, vêlage - première insémination, vêlage - insémination fécondante ainsi que la chute de taux de conception à la première insémination et le taux de gestation en général [16-18, 26].

5.1. Conséquences des infections utérines

5.1.1. Altération de la fonction ovarienne

Les vaches qui abritent des bactéries dans leurs utérus, durant la période du postpartum, présentent un retard de reprise de l'activité ovarienne. Les toxines bactériennes notamment les lipopolysaccharides (LPS) provoquent une inhibition de synthèse de GnRH et de LH avec diminution de la sensibilité de l'hypophyse à l'hormone de GnRH. Il en résulte un développement des petits follicules avec formation de corps jaunes de faibles tailles, qui produisent à leur tour une faible quantité de progestérone [26, 160-162].

En plus, l'infection utérine est souvent associée à un allongement de la phase lutéale et à un pourcentage très élevé des kystes ovariens dus à l'absence de la synthèse de la PGF2 α par les cellules endométriales [163].

5.1.2. Infertilité à chaleurs normales (Repeat breeders)

Une vache Repeat Breeder (RP) se définit généralement comme une vache non gestante, cliniquement normale, avec une cyclicité régulière et ayant été, au minimum, inséminée trois fois [164].

Sous l'effet des endotoxines bactériennes, l'endomètre de la vache présente des zones de nécrose et de destruction tissulaire et altération de la fonction endocrinienne. L'utérus dans ce cas n'est pas capable de recevoir l'œuf fécondé et une mortalité embryonnaire précoce est inévitable. En plus, la faible synthèse de la progestérone dans le cas des infections utérines augmente le risque de mortalité embryonnaire et la vache se retrouve en chaleur durant le cycle suivant [160]. Azawi et al. [98] ont montré que 76,3% des bufflonnes, qui ont été diagnostiquées vides à trois reprises successives, souffraient d'endométrite.

5.1.3. Diminution des performances de fertilité et fécondité

Chez les vaches atteintes d'endométrites, les paramètres de la reproduction sont altérés (Cf. Tableau 9), notamment, l'intervalle vêlage-vêlage (V-V), vêlage-1^{ère} insémination (V-IA), vêlage-insémination fécondante (V-IF) et le nombre d'insémination par conception (N°/IF) [39,

50]. L'allongement de l'intervalle V-IA est de 7 jours en moyenne, alors que l'allongement de l'intervalle V-IF est de 10 à 31 jours [7, 41, 75, 165] dans les cas des infections utérines. Cet allongement est dû à une extension de la phase lutéale associée à un problème de sécrétion de la PGF2 α et absence d'ovulation, cela est due souvent à l'effet des endotoxines des bactéries en cause (ex : *E. coli*) [12, 50] ou à l'effet des cytokines fortement produites.

Tableau 9 : Mesure des performances reproductrices des vaches laitières Holstein avec endométrite et sans endométrite (n = 1865) [7].

Variables	Endométrite		
	Oui	Non	P
Jours moyens : 1ere insémination (JEL*)	80	75	0.002
Taux de conception : 1ere insémination (%)	29.8	37.9	0.01
Risque cumulatif de gestation (%)	70.6	79.6	0.0004
Gestante à 120 JEL (%)	33.5	47.4	0.0001
Moyenne de jours ouverts (JEL)	150	122	0.0001
Nombre d'inséminations / vache gestante	2.35	2.15	0.06
Pourcentage de réforme : toutes conditions confondues (%)	27.9	21.1	0.01
Pourcentage de réforme : cause reproduction (%)	6.7	3.8	0.02

* JEL : jours en lactation

LeBlanc et al. [7] a démontré que la présence d'une décharge purulente et un diamètre cervical de plus de 7.5 cm était associé à une faible fertilité. Au fur et à mesure que la décharge utérine devienne plus purulente, le problème d'infertilité devient plus important. Une décharge muco-purulente augmente le temps pour avoir une gestation. Une décharge purulente ou nauséabonde était souvent associée à une réduction de 20% de taux de gestation [14]. En fin, le taux de réforme des vaches suite à un échec répété d'insémination est le double chez les vaches atteintes d'endométrite par rapport à celui des vaches indemnes [7].

Une étude plus récente confirme l'impact des endométrites sur les performances de la reproduction [166]. Les chercheurs ont trouvé que *T. pyogenes* diminue par 34% le risque de gestation et prolonge par 56 jours le temps d'avoir une gestation, en comparaison avec des vaches ne portent pas *T. pyogenes* dans leurs utérus. Il semble que l'endométrite clinique cause plus de problème que la forme subclinique. La chance d'avoir une gestation et

l'intervalle vêlage – gestation est de 47% et 57 jours pour la forme clinique contre 27% et 42 jours pour la forme subclinique [166].

5.1.4. Coûts pour l'éleveur

Le cout de la maladie est de 1083€ (146 0816 DZD*) par 100 vaches d'un cheptel donné. Le cout annuel des infections utérines est 1.4 milliard euros à l'Union Européen et 650 millions dollars aux Etats Unis [102].

L'impact financier des infections utérines est dû essentiellement à l'allongement de l'intervalle vêlage - première insémination ce qui oblige l'éleveur à bien nourrir la vache pour favoriser la reprise de l'activité ovarienne. L'augmentation de nombre d'insémination pour avoir une gestation par vache représente aussi une facture très lourde pour l'éleveur. Il faut ajouter les pertes économiques liées au traitement, à la perte de lait et à l'augmentation de taux de réformes des vaches infertiles [50, 130].

Esslemont et Kossaibati [167] ont démontré que le cout de traitement des infections utérines et de la diminution de production laitière qui en résulte est de €91 (11 994 DZD*). Ajouter aussi le cout de l'augmentation de nombre d'insémination, de l'allongement de l'intervalle V-V et de réforme des vaches infertiles qui est de €101 (13 312 DZD*). Le cout total d'un cas d'infection utérine est donc de €192 (25 307 DZD*) (* taux de change moyenne de l'année 2017 : €1= 132 DZD).

La majorité de ces pertes on peut les éviter par un dépistage efficace et précoce et un traitement adéquat des animaux avant la fin de la période d'attente physiologique de reproduction.

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE DES ENDOMETRITES

1. Introduction

Le suivi de l'évolution de la réaction inflammatoire dans l'utérus à un stade précoce est essentiel pour identifier les vaches à risque de développer d'endométrite. La mise au point d'un nouvel outil de diagnostic des endométrites basé sur l'analyse de mucus cervico-vaginale (MCV), il y a d'autres raisons pourquoi MCV représentent plusieurs intérêts. Premièrement, les méthodes de diagnostic actuelles nécessitent une technicité et un matériel adapté tels que le pistolet d'insémination, l'instrument de biopsie, le cathéter de Foley et la cytobrosse adaptée aux grands animaux. Elles ne sont pas dépourvues de risque pour l'avenir reproducteur de l'animal. A l'inverse, la collecte manuelle du MCV est simple et facile à réaliser. Par ailleurs, le MCV reflète les origines diverses des éléments figurés ou non qui le constituent [168, 169].

Enfin, divers travaux consacrés à la réaction inflammatoire de l'utérus au cours du postpartum ont identifié l'implication de 73 gènes et 31 miARN et l'expression différente de protéines inflammatoires telles que le sérum amyloïde A (SAA) et l'haptoglobine (HP). Ces résultats indiquent que la détermination des biomarqueurs inflammatoires durant la première semaine postpartum peut être utilisée pour prédire les vaches qui développeront une endométrite à un stade ultérieur. Selon les études de Prof. O'Farrelly [170-172] et les études antérieures chez l'être humain [168, 169], et la vache [173], il semble que le MCV peut remplacer le lavage et la biopsie utérine pour détecter les biomarqueurs pour prédire l'endométrite chez les bovins laitiers.

2. Composition du mucus

Le mucus est composé de mucines, d'ADN, de lipides, d'ions, de protéines, de cellules et d'eau. Les modifications de sa composition en altèrent les propriétés physiques et immunologiques [174]. Les propriétés physiques du mucus dépendent essentiellement de sa composition en mucines [174]. Le mucus est composé principalement de fibres de mucine croisées, empaquetées et enchevêtrées de 0-40 Md de taille [175]. Les fibres de mucine sont

des protéines glycosylées via des résidus proline, thréonine et / ou sérine [176]. Les mucines sont chargées négativement car la plupart des glycoprotéines de mucine sont riches en acide sialique et en sulfate, ce qui augmente la rigidité du polymère [175].

3. Rôle immunologique du MCV

Le mucus représente une barrière physique qui prévient l'adhésion et la pénétration de l'épithélium par des virus et des bactéries et qui en assure leur élimination [177]. Comme dans de nombreux organes différents, le mucus joue un rôle important dans la protection du tractus génital pendant la période postpartum lorsque le cervix est largement ouvert et que l'utérus est exposé à la contamination bactérienne [178]. Le mucus des voies aériennes supérieures chez l'être humain est le mucus le plus détaillé dans sa composition et son analyse. Parmi la fraction protéique du mucus des voies aériennes supérieures, 45% représentent les protéines de défense de l'hôte et de réponse immunitaire (Cf. Tableau 10) [177]. Cependant, chez la jument, il a été prouvé que l'activité de phagocytose dans le mucus génital est très limitée en raison d'une faible activité d'opsonisation [179]. Bien que le taux des immunoglobulines dans les sécrétions utérines soit normal, le complément est rapidement et facilement dégradé, ce qui peut expliquer pourquoi le nombre de neutrophiles est très élevé peu de temps après l'infection, mais leur activité phagocytaire est limitée [179].

L'Ig A du mucus est impliqué dans la capture des bactéries et en réduire l'accès à l'épithélium. De même, la lactoferrine fixe le fer nécessaire à la multiplication bactérienne. Enfin, les lysozymes largement abondants tuent les bactéries en endommageant les parois cellulaires [178, 180].

Tableau 10 : Composition du crachat de l'être humain analysé par un spectromètre relève une présence abondante des protéines associées à l'immunité innée [177].

Protéines retrouvées dans les sécrétions de culture cellulaire et du crachat	Protéines retrouvées spécifiquement dans le crachat
Macrophage migration inhibitory factor	Ig alpha-1 chain C region
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	Ig mu heavy chain disease protein
Polymeric-immunoglobulin receptor	Ig kappa chain C region
LPLUNC1/Von Ebner minor salivary gland protein	Ig gamma-1 chain C region
PLUNC/ SPLUNC1/Palate lung and nasal epithelium clone protein	Ig lambda chain C regions
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion	Immunoglobulin J chain
Deleted in malignant brain tumors 1/DMBT1 glycoprotein 340/gp340	Ig mu chain C region
Lysozyme	Ig heavy chain V-III region TIL
Lactotransferrin	Azurocidin/Cationic antimicrobial aptoglobin
Clara cell phospholipid-binding protein/Uteroglobin	α 1-acid glycoprotein 1/Orosomuroid 1
Neutrophil defensin 1/Defensin, α1	Pulmonary surfactant-associated protein B
Galectin-3 binding protein/Mac-2 binding protein	Pulmonary surfactant-associated protein A1
Leucine-rich α2-glycoprotein/LRG	Trefoil factor 3/Intestinal trefoil factor
CD59 glycoprotein/MAC-inhibitory protein	Haptoglobin
Clusterin/Apolipoprotein J, TRPM-2 b2-microglobulin	
Dermcidin/Preproteolysin	
Complement C3	
Complement factor H/H factor 1	
Zinc-α2-glycoprotein	

4. Rôle physique -mécanique du MVC

Le mucus utérin est transporté dans le vagin, où il est mélangé avec du mucus vaginal et cervical, et occasionnellement expulsé à l'extérieur du vagin pour nettoyer le tractus génital des bactéries et des cellules mortes [178, 181]. Même si le col de l'utérus joue un rôle important en tant que barrière physique qui protège l'utérus de la contamination, nous savons

depuis longtemps que l'ouverture occasionnelle du cervix est très importante pour l'élimination du mucus utérin surtout pendant la période postpartum, et l'échec d'ouverture du cervix conduit à l'accumulation de mucus et le développement de pyomètre [178]. En plus, l'accumulation du mucus induit une diminution de l'activité phagocytaire des neutrophiles recrutés dans la lumière utérine [182]. Dans l'inflammation chronique telle que la fibrose kystique (FC), s'appelle aussi mucoviscidose, l'élément le plus important de la gravité est le manque d'élimination du mucus du poumon plutôt qu'une augmentation de la production de mucus [177]. Tout problème lié à l'évacuation du mucus favorise son accumulation et la formation de plaques épaisses et collantes qui offrent un environnement favorable à la croissance bactérienne et augmentent le risque d'infection à un stade précoce et la persistance de l'inflammation utérine comme endométrite [177].

5. Traitement et analyse du MCV

En raison des propriétés physiques particulières du mucus, un traitement préliminaire est primordial avant toute analyse des biomarqueurs en phase soluble. Cependant, les techniques et les réactifs nécessaires pour homogénéiser le mucus et extraire la phase solide du matériaux visqueux peuvent affecter de manière significative la concentration détectable de nombreux biomarqueurs de l'inflammation [183]. N-acétyle-L-cystéine (NAC) et Dithiothreitol (DTT) ou son isomère optique le Dithioerythritol (DTE) sont couramment utilisés pour homogénéiser le mucus par la réduction des liaisons disulfure et empêcher leur formation entre les résidus cystéine des protéines dans le mucus [183-185]. En revanche, de nombreuses études ont indiqué que la DTT peut affecter la concentration détectable de nombreuses cytokines et les protéines de la phase aiguë dans le mucus en utilisant des tests ELISA, et ont conclu que le mucus doit être utiliser, pour le dosage des cytokines, sans traitement préalable par un agent réducteur [186, 187].

Etant des protéines, les cytokines et chimiokine contiennent des ponts sulfuriques entre les résidus de cystéine, et de ce fait l'utilisation des agents réducteurs peut affecter la stabilité de ces protéines et diminue leurs détections par la technique d'ELISA. Par exemple, IL-6 contient 4 résidus cystéine conservés entre plusieurs espèces (i.e. être humain et les vaches) connectés par 2 ponts disulfures (Cys 44-Cys 50 and Cys 73-Cys 83) [188, 189]. Les deux ponts disulfures pourraient être réduits par une réduction chimique [190] ou par des conditions de

non-dénaturation [191]. De ce fait, l'utilisation d'un agent réducteur diminue la stabilité d'IL-6 ce qui pourrait diminuer sa détection par les anticorps, du fait que les ponts disulfures sont responsables du maintien de l'intégrité structurale des sites de fixation au récepteur plutôt que de la stabilité conformationnelle [190, 191]. L'utilisation de DTT à forte concentration diminue par 43% la concentration détectée à partir du standard de IL-6 [186]. IL-8 à son tour porte 4 résidus cystéines liés par 2 ponts disulfures et la réduction de ces ponts rapidement rend IL-8 inactif [192], ce qui pourrait diminuer sa détection par ELISA.

6. Inflammation physiologique -saine- de l'utérus

Pendant la gestation, l'utérus est soumis à un changement massif de sa taille, morphologie et histologie pour bien concevoir le fœtus pendant tous les 9 mois de grossesse. Au fur et à mesure que le fœtus finit sa croissance, l'utérus commence à se préparer à la mise-bas en diminuant la production de progestérone et augmentant la production d'œstrogène pour enlever l'opercule, un bouchon de mucus cervical qui scelle le cervix. La libération du cortisol par la glande surrénale du fœtus est fortement impliquée dans la conversion de synthèse de progestérone en œstrogène et la production de prostaglandine et le mécanisme de parturition [193].

Après le part, l'utérus doit retrouver sa taille initiale dans un processus appelé involution utérine. Au cours de l'involution utérine, l'utérus de la vache perd plus de 50% de sa taille avant le vêlage en seulement 10-14 jours [194], sinon la vache est fortement exposée à une infection sévère [172]. À la fin de l'involution utérine, l'utérus aurait perdu plus de 80% de sa taille avant le vêlage [195]. Le mécanisme de l'involution utérine est qualifié comme une inflammation saine ou physiologique dont les différentes étapes de la cascade inflammatoire sont détaillées dans les paragraphes suivants.

5.2. Les protéines de la phase aiguë (PPA)

L'inflammation saine de l'utérus pendant l'involution utérine est régie par des mécanismes hormonaux et immunitaires [196, 197]. Deux à trois semaines avant le vêlage, on observe une augmentation de la production de protéines de la phase aiguë (PPA) pour contrôler l'inflammation physiologique du postpartum [37, 198]. Les lésions tissulaires et le stress associé au vêlage contribuent principalement à l'inflammation postpartum en induisant

la sécrétion de différentes cytokines (IL-1 et IL-6) et de chimiokines (CXCL5, IL-8) et augmentant la sécrétion de PPA [35, 37, 198-200]. Les PPA sont des protéines circulantes dans le sang et sont sécrétées principalement par le foie dans le cadre de l'inflammation aiguë [200]. Parmi les diverses PPA qui sont produites chez les vaches, haptoglobine (Hp) [201], sérum amyloïde A (SAA) [202] et α 1- acide glycoprotéine [53] sont les premiers biomarqueurs inflammatoires positivement détectés dans le cas d'une inflammation [200]. Cette synthèse des PPA est induite principalement par le stress associé à la sécrétion de cortisol par le fœtus et amplifiée par le traumatisme associé au processus de vêlage. Les PPA interviennent physiologiquement dans l'involution utérine, la cicatrisation des plaies et renouvellement tissulaire [198]. Puisque la contamination bactérienne de l'utérus se produit chez toutes les vaches au moment du vêlage ou juste après [31], les PPA contribuent principalement à limiter la contamination et à éliminer les bactéries avant la fin de la troisième semaine postpartum [200, 203].

5.2.1. Sérum Amyloïde A (SAA)

Le SAA a une activité d'opsonisation élevée, liée à sa forte affinité au ligand des bactéries Gram-négatif « OmpA » ce qui améliore la phagocytose de ces bactéries par les cellules immunitaires innées [204, 205]. De plus, le SAA, adhère à la paroi des bactéries pour fixer le complément en vue d'améliorer l'élimination des bactéries. Le SAA contribue également à réduire l'hyperthermie et la flambée des neutrophiles. Elle influence également le chimiotactisme des monocytes, des PMN et des lymphocytes T. Elle favorise également la mobilisation du calcium par les monocytes et l'activation plaquettaire [206]

Sa sécrétion hépatique est contrôlée via la voie de transcription NFkB [207]. Alors que SAA1 et SAA2 sont exprimés dans le foie et le SAA3 est produit par de nombreux organes, y compris la glande mammaire [208]. Ce dernier est également produit localement par les cellules épithéliales de l'endomètre et que son expression génétique est régulée positivement en réponse à l'infection par *E. coli* [202]. Cette régulation locale génère une élévation systémique du taux de SAA pendant la première semaine postpartum qui revient à sa valeur de référence après 8 semaines, comme processus de régulation de l'inflammation [209]. Pour confirmer la production locale de SAA dans l'utérus, la même équipe a mené une autre étude sur le séquençage des gènes afin de comparer l'expression génétique de différents biomarqueurs inflammatoires entre les vaches ayant une endométrite cytologique et des

vaches saines au début du postpartum (jour 7 postpartum) et au jour de référence pour le diagnostic d'endométrite (jour 21 postpartum) [209]. Ils ont constaté que les gènes de SAA1 ($P = 0,0001$), SAA3 ($P = 0,003$) et la forme mammaire (M-SAA3.2) ($P = 0,01$) étaient significativement surexprimés dans l'utérus chez les vaches saines 7 jour après le part indiquant son élévation normale au début Postpartum [209]. Dans cette étude, les vaches ayant une endométrite cytologique avaient une régulation locale des gènes et systémique des protéines deux fois plus élevée que le groupe sain au jour 7 postpartum [209].

La SAA est considérée comme une PPA majeure puisque sa sécrétion est fortement influencée par l'état de santé de différentes espèces [199]. Sur le plan systémique, différentes études ont montré que la concentration de SAA3 est significativement augmentée chez les vaches ayant une endométrite subclinique [210] ou pyomètre [211] (Cf. Tableau 11). Dans ces deux études, le niveau de SAA dans les lavages utérins n'était pas significativement différent entre les deux groupes. Cette indifférence pourrait être due au fait que le mucus utérin était dilué dans le tampon phosphate salin (PBS) infusé dans l'utérus, et le rapport de dilution ne pouvait pas être déterminée exactement du fait que seulement 80% de PBS a été récupéré. Vingt-deux jours après le part, le taux de SAA dans le plasma était plus élevé chez les vaches ayant une endométrite clinique par rapport aux vaches saines [212] (Cf. Tableau 11).

5.2.2. Haptoglobine (Hp)

La synthèse de l'Hp est stimulée par les cytokines, comme une PPA de deuxième ligne de défense. Son élévation dans le sang est caractéristique d'un processus inflammatoire chronique [200, 206]. L'Hp est aussi une PPA majeure et sa concentration normale dans le sang 3 jours postpartum est de 0,6 g / l et diminue à la moitié au 6^{ème} jour postpartum [37]. Dans cette dernière étude, les vaches ayant un taux systémique de Hp supérieur à 1 g/l au troisième jour après le vêlage présentaient un risque accru de développer une métrite puerpérale de 6,7 fois. Il semble que cette augmentation de la production de Hp commence avant le vêlage, puisque les vaches atteintes de métrite puerpérale avaient un taux plasmatique de Hp plus élevé par rapport aux vaches saines 1 semaine avant le vêlage ($P < 0,001$) et cette augmentation persiste les six premiers mois postpartum [209], ce qui représente une inflammation utérine prolongée, sous forme d'endométrite.

Tableau 11 : Études visant à comparer les concentrations de biomarqueurs dans la cavité utérine (UT) ou le mucus vaginal (MV) entre individus sains ou présentant une pathologie.

Technique de collecte de mucus /origine de mucus	Jour postpartum de prélèvement	Biomarqueurs mesures	Espèces	Motif d'analyse	Objectifs de l'étude	Références
UT	60	TNF- α , IL-6, IL-10, SAA et Hp	Vache	Endométrite subclinique	Comparer les niveaux de biomarqueurs entre le sang et le lavage utérin et entre les vaches avec endométrite subcliniques et vaches saines	[210]
	5, 22 et 40					[212]
	70-90				Pyromètre	Comparer les niveaux de biomarqueurs entre le sang et le lavage utérin et entre les vaches avec pyromètre et vaches saines
	28, 42 et 54	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, et IL-10		Endométrite Clinique et subclinique	Comparer les niveaux de biomarqueurs entre le sang et le lavage utérin et entre les vaches avec endométrite clinique, subcliniques et saines	[213]
MV	7 and 21dpp	IL-1 β , IL-6, IL-8, SAA, Hp et C5b	Vache	Endométrite clinique	Comparer biomarqueurs de l'inflammation dans le MCV entre vaches atteintes 'endometrite clinique et saines, a 7 et 21 JPP	[214]
		IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8		Dystocie	Comparer les concentrations d'IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 dans le mucus vaginal entre les vaches avec vêlage dystocique et celle avec vêlage normal	[215]
	7	IL-8			Comparer les concentrations d'IL-8 dans le mucus vaginal entre les vaches avec vêlage dystocique et celle avec vêlage normal	[173]
	2-6	IL-6 et IL-8			Comparer les niveaux d'IL-6 et IL-8 juste après le part entre le sang périphérique et le mucus vaginal	[216]
	Génisses	C3	Trichomonase	Dosage et étude de stabilité de complément C3 chez les génisses infectées par T. foetus	[217]	
	140-168	IL-8	Femme	Accouchement prématuré	Etude de la corrélation entre le niveau d'IL-8 et la microflore vaginale chez les femmes a risque d'un accouchement prématuré	[218]
	ND	Analyse de la protéome globale		Cancer de cervix	Sélection des protéines biomarqueurs qui peuvent prédire papillomavirus humain a un stage précancéreux.	[169]
	Gestation et 30 JPP	IL-8 et granulocytes		Rôle d'IL-8 dans l'accouchement	Comparer les niveaux d'IL-8 et granulocytes dans le mucus vaginal entre les femmes non enceintes, enceintes et après accouchement	[219]

Même si la production locale de Hp par les cellules endométriales n'est pas encore confirmée, la concentration de Hp dans le sérum et le lavage utérin ($P < 0,001$) est significativement plus élevée chez les vaches souffrant d'endométrite subclinique, par rapport aux vaches saines 60 jours après l'accouchement [210] (Cf. Tableau 11). Dans une autre étude menée par les mêmes chercheurs, le niveau de Hp dans le sang systémique et le lavage utérin de vaches avec endométrite subclinique étaient significativement plus élevés que dans le groupe témoin 22 et 40 jours postpartum ($P < 0,001$) [212] (Cf. Tableau 11). Hp peut être pénétré dans la lumière de l'utérus à partir du sang où il était significativement plus élevé par rapport aux lavages utérins [210].

5.3. Les cytokines

L'altération de la signature génétique dans le tissu endométrial a été rapportée chez des vaches présentant une endométrite clinique [220] et une endométrite subclinique [221] comparativement aux vaches saines. De même, au niveau protéique, les concentrations des cytokines sont significativement affectées par l'état de santé de l'utérus [171, 222]. De nombreuses cytokines et chimiokines ont été étudiées génétiquement dans le tissu utérin et ont été dosé avec succès leur taux de protéines dans le sang systémique et les lavages utérins, notamment TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et IL-10 [171, 210-212, 223]. Par conséquent, le dosage de la concentration de cytokines dans la sécrétion utérine ou le mucus vaginal est une technique utile et un test sensible pour prédire les vaches avec un état inflammatoire utérin anormal.

5.3.1. Interleukine 1 β

IL-1 β est un membre de la famille des cytokines de l'interleukine 1 et est produit par des macrophages activés pour déclencher la réaction inflammatoire. IL-1 représente le principal médiateur de l'inflammation utérine dont sa sécrétion est provoquée par des lésions tissulaires associées à la parturition et à la nécrose tissulaire qui en résulte [215]. Les vaches avec vêlage dystocique ont un taux plasmatique d'IL-1 β plus élevée par rapport aux vaches eutociques 3 semaines postpartum [215].

5.3.2. Interleukine 6

L'interleukine 6 est une cytokine inflammatoire importante avec des propriétés pro- et anti-inflammatoires. Dans l'inflammation utérine précoce, les cellules endométriales produisent de l'IL-6 en association avec de nombreuses autres chimiokines pour recruter les neutrophiles au site d'inflammation, où PNN produit la forme soluble du récepteur IL-6 (sIL-6R) par clivage prototypique de la forme liée à la membrane ((mIL6R) (Cf. Figure 7). La sensibilisation des cellules endométriales par la signalisation des tans IL-6 conduit à un changement dans la synthèse de CXC chimiokines des chimiokines CXC (IL-8) aux chimiokines CC (CCL5). A ce stade, l'IL-6 induit une apoptose des neutrophiles, mais la trans-signalisation de l'IL-6 assure le maintien des cellules CD4+ et TH17, conduisant au passage de la phase dominée par les neutrophiles à la phase dominée par les macrophages et des lymphocytes.

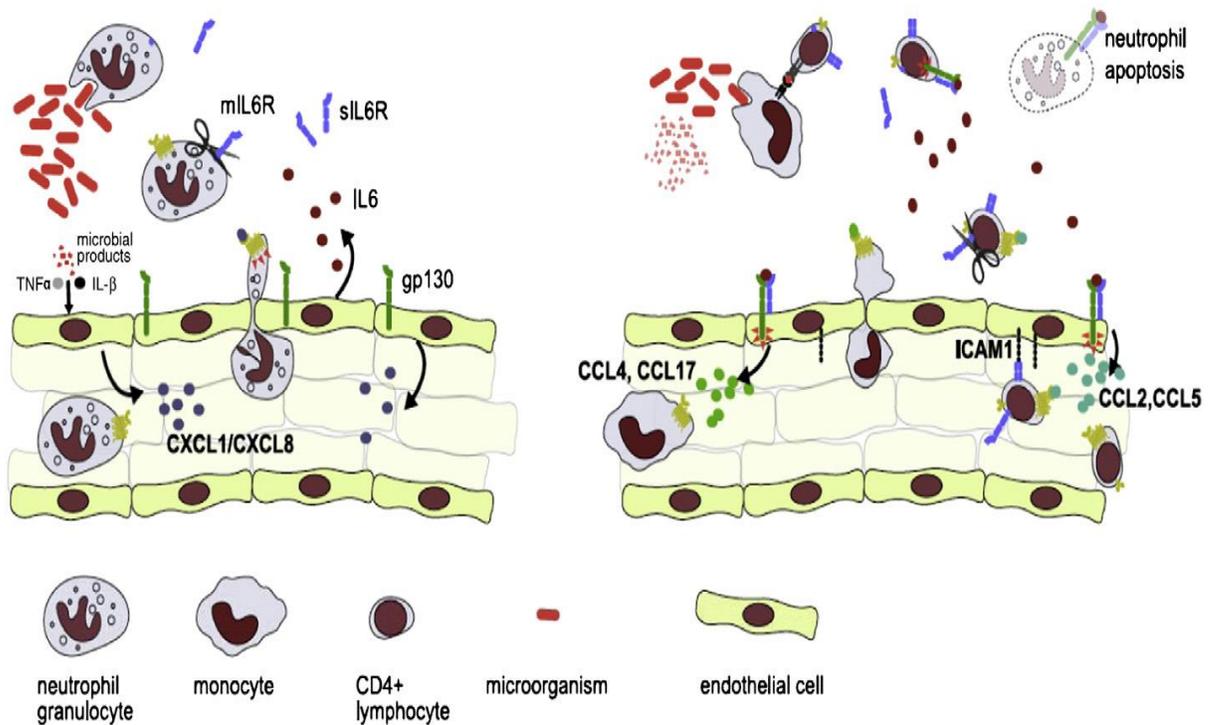


Figure 7: Rôle de l'IL-6 dans la modulation de la phase aiguë de l'inflammation [224].

5.3.3. Interleukine 8

L'interleukine 8 (IL-8) est un membre de la famille des chimiokines (CXC), doté d'une activité chimiotactique importante pour les neutrophiles et est associée à plusieurs maladies

inflammatoires notamment l'endométrite [225]. Chez la vache, l'endométrite est significativement associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm de IL8 dans l'endomètre, et la perfusion intra-utérine de IL8 exogène reproduit l'endométrite [85, 226].

IL-8 est un excellent indicateur de l'inflammation car dans les organes sains, son niveau est détecté à des niveaux très faibles, mais sa détection est augmentée de 10 à 100 fois en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, aux produits bactériens ou viraux et aux stress cellulaires [227]. Les cellules stromales endométriales infectées in vitro avec différentes souches de BoHV-4 augmentent l'expression du gène et la sécrétion protéique d'IL-8 [228]. Il semble que la régulation positive du gène de IL-8 soit très spécifique au tissu enflammé et que le buffle avec endométrite ait une régulation positive de l'ARNm de l'IL-8 seulement dans l'utérus alors que l'expression de l'ARNm pour l'IL-8 dans l'ovaire et le tissu mammaire ne sont pas significativement différents par rapport aux buffles sans endométrite (Cf. Figure 8) [225].

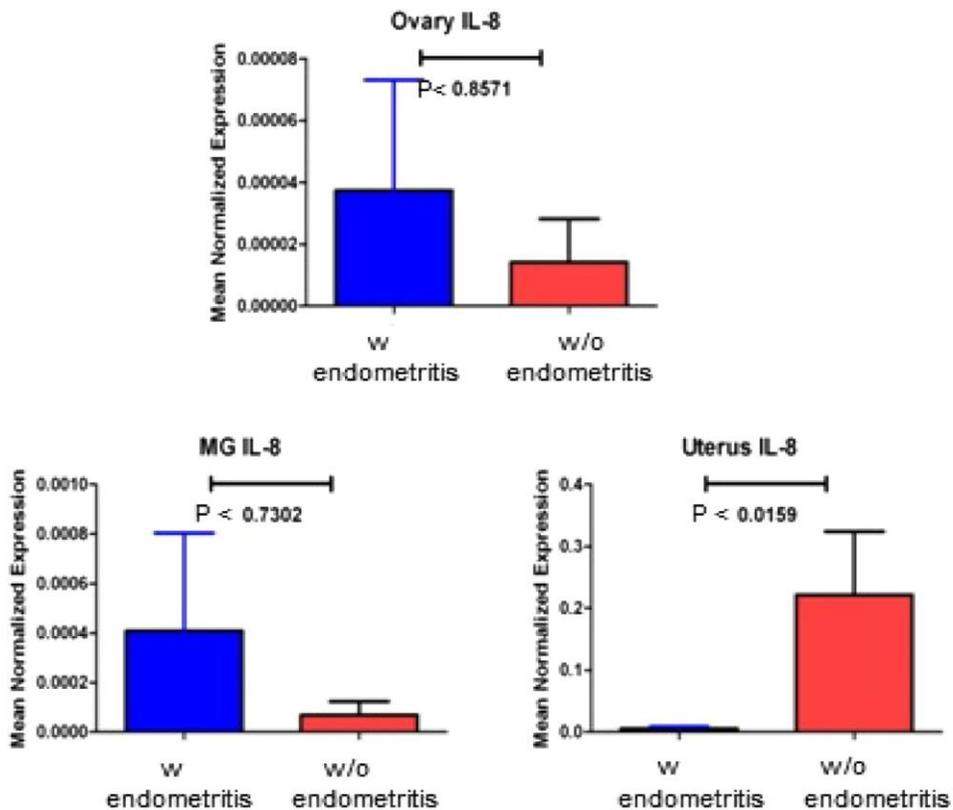


Figure 8: Expression normale moyenne de l'ARNm de l'IL-8 dans l'utérus, l'ovaire et la glande mammaire (MG) du buffle égyptien avec (w) et sans endométrite (w / o) en utilisant la PCR quantitative en temps réel. Les données sont présentées comme la moyenne \pm DE de trois expériences [225].

5.4. Le système de complément

L'activité de la phagocytose en cas d'infection utérine est un processus dépendant du complément [179]. Cependant, chez les vaches comme chez la jument, l'activité d'opsonisation est au niveau le plus bas chez les animaux subissant une infection utérine et une inflammation chronique [42, 140, 179]. L'activité de phagocytose est basée sur le complexe des cellules phagocytaires, pathogène, système du complément (voie alternative) et de l'immunoglobuline (voie classique) (Cf. Figure 9) [229].

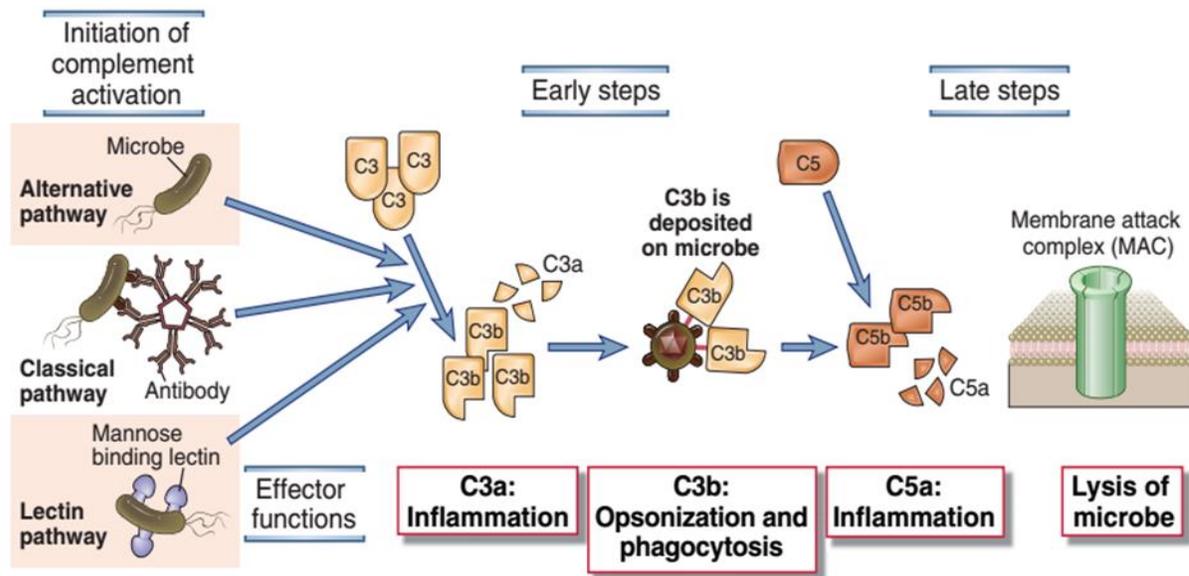


Figure 9: Représentation schématisée des voies d'activation du complément [229].

Dans de nombreuses études, il a été rapporté que l'endométrite est associée à un taux élevé d'infiltration de neutrophiles et un niveau normal des immunoglobulines dans l'utérus, mais l'activité phagocytaire des neutrophiles est compromise [26, 42, 140, 179]. La protéine C3 du complément est facilement dégradée dans la sécrétion utérine, ce qui conduit à une faible activité d'opsonisation et favorise le maintien de l'infection [179, 217]. Chez la jument, l'activation du système de complément et le dépôt de C3b sur la paroi des bactéries représente l'élément clé pour une activité phagocytaire réussie des neutrophiles en cas d'infection utérine induite par *Streptococcus zooepidemicus*. Chez les vaches, le C3 a également été confirmé comme étant très important pour une réponse immunitaire efficace contre une infection vaginale induite par *Tritrichomonas foetus* [217].

C3 et C5 sont des éléments protéiques faisant partie du système de complément. Lorsqu'il est attaché à la forme clivée C3b, C5 est clivé par une enzyme C5 convertase pour donner une chimiokine inflammatoire importante C5a et une molécule effectrice C5b. L'assemblage de la composante terminale du complément initiée par C5b conduit à la formation du complexe de membrane attaque sur la surface cellulaire des agents pathogènes. En conséquence, de multiples pores se forment sur la membrane lipidique ce qui perturbe le gradient de protons à travers la membrane cellulaire et tue les microbes [230].

7. Inflammation pathologique -chronique- de l'utérus

Souvent, le système immunitaire de la vache au début du postpartum est perturbé en raison du bilan énergétique négatif (BEN) [231, 232] et de l'hypocalcémie [132] qui perturbent la fonction immunitaire des neutrophiles et de ce fait retardent l'involution utérine et la clairance des bactéries [232, 233]. Si les bactéries ne sont pas complètement éliminées peu après le vêlage, l'inflammation de l'utérus peut persister et se transformer en inflammation pathologique comme l'endométrite [170].

Les cellules endométriales épithéliales et stromales endommagées libèrent des molécules associées à des lésions (Damage-Associated Molecular Pattern « DAMP ») comme IL-1 qui se lie à leurs récepteurs (IL-1R) sur les cellules endométriales épithéliales et stromales pour renforcer la réponse inflammatoire [35]. A ce stade, les chimiokines sont principalement représentées par des α chimiokines, à savoir CCL4, CCL3 et CCL2. Regakine-1 est CC qui agit en synergie avec CXCL8 (IL-8) et le complément du système C5a pour attirer les neutrophiles et stimuler l'inflammation chronique [234].

Les vaches présentant une hypocalcémie ont une altération de la fonction du système immunitaire, en particulier l'activité phagocytaire des neutrophiles, car Ca^{2+} est nécessaire au contrôle de fusion des granules secondaires avec la membrane phagosomale et ainsi digérer les microbes phagocytés [233, 235, 236]. De plus, Ca^{2+} est un élément critique dans l'activation de la NADPH oxydase, nécessaire pour produire des espèces réactives d'oxygène (Reactive Oxygen Species (ROS) pour digérer et tuer efficacement les microbes phagocytés [237]. Pour réapprovisionner Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique (RE), les récepteurs localisés dans RE

signalent la membrane plasmique pour ouvrir des canaux de Ca^{2+} dans un processus rétrograde appelé entrée en-magasin de Ca^{2+} (store-operated Ca^{2+} entry) qu'est impossible en cas d'hypocalcémie [238, 239]. Par conséquent, les vaches souffrant d'hypocalcémie subclinique ont un risque accru de développer une fièvre, métrite et métrite puerpérale par rapport aux vaches ayant un taux normal de calcium, en particulier si la concentration de calcium dans le sérum a diminué au cours des trois premiers jours postpartum (taux de risque ajusté = 1,28; 95% IC, pour la métrite) [240].

Une inflammation utérine forte et persistante peut affecter la fonction normale des tissus de l'endomètre et de l'ovaire et perturber les performances de reproduction de la vache [50, 241]. La surexpression génétique des cytokines [85, 171, 242] et la sécrétion de protéines [241, 243] ont été enregistrées chez les vaches avec infection utérine. L'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-8 inhibe l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion d'œstrogènes par les follicules [241, 243, 244]. L'œstrogène est une hormone cruciale pour l'ovulation du follicule dominant et la faible production de cette hormone conduit à l'échec de l'ovulation. L'aromatase est une activité enzymatique dans les cellules de la granulosa qui assure la conversion des androgènes produites par les cellules de la thèque interne en œstrogène. L'inhibition de l'activité de l'aromatase conduit à l'accumulation des œstrogènes dans les cellules de granulosa responsables de leur apoptose sous l'effet cytotoxique de l'œstrogène et par conséquent l'atrésie du follicule dominant. La contamination bactérienne de l'utérus après le vêlage retarde la reprise de l'activité ovarienne et complique l'altération de la stéroïdogenèse [50]. Le LPS de *E. coli* a un effet inhibiteur direct sur l'activité de l'aromatase [245] et un effet stimulateur sur la synthèse de la progestérone, par l'initiation de la production de TNF- α dans les cellules ovariennes [246]. La surproduction d'IL-1 β et de TNF- α rapportée en cas d'endométrite augmente la sécrétion de progestérone qui a une rétroaction négative sur la croissance folliculaire et l'ovulation, conduisant à l'anœstrus et l'infertilité [50, 246]. Dans les rares cas où le follicule dominant est ovulé, l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les cellules ovariennes inhibe la production de progestérone [247] ce qui augmentent le risque d'avortement précoces et l'accouchement prématuré.

Deuxième partie

Etude expérimentale

CHAPITRE 1 : COMPARAISON DE MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DES ENDOMETRITES

1. Introduction

La détection aussi précoce et exacte que possible d'une infection utérine contribue à l'amélioration des performances de reproduction. [28].

Les deux principaux objectifs de cette étude sont :

- de déterminer la prévalence de différentes formes d'endométrite clinique, subclinique et cytologique.
- D'évaluer la sensibilité et la spécificité des méthodes de diagnostic.

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillon de l'étude

Quatre-vingt-dix-neuf (99) vaches laitières de race Prim-Holstein (n=73) et Montbéliarde (n = 26) en période de postpartum (21 à 60 JPP), appartenant à 14 élevages laitiers, ont été utilisées pour cette étude.

2.2. Méthodes de diagnostic

a) Examen de mucus vaginal

L'examen du contenu vaginal a été réalisé selon le protocole de Pleticha et al. [48] et Plöntzke et al [248]. Après une bonne contention de la vache, une main gantée (gants d'insémination, Cyclovet. Polysem®. France) est introduite à travers le vagin jusqu'à l'orifice caudal du col utérin et par un léger mouvement de raclage, la main gantée est ensuite retirée et le mucus adhérent sur le gant est inspecté (Cf. Figure 10 et 11).



Figure 10: Examen transvaginal mettant en évidence une décharge utérine purulente

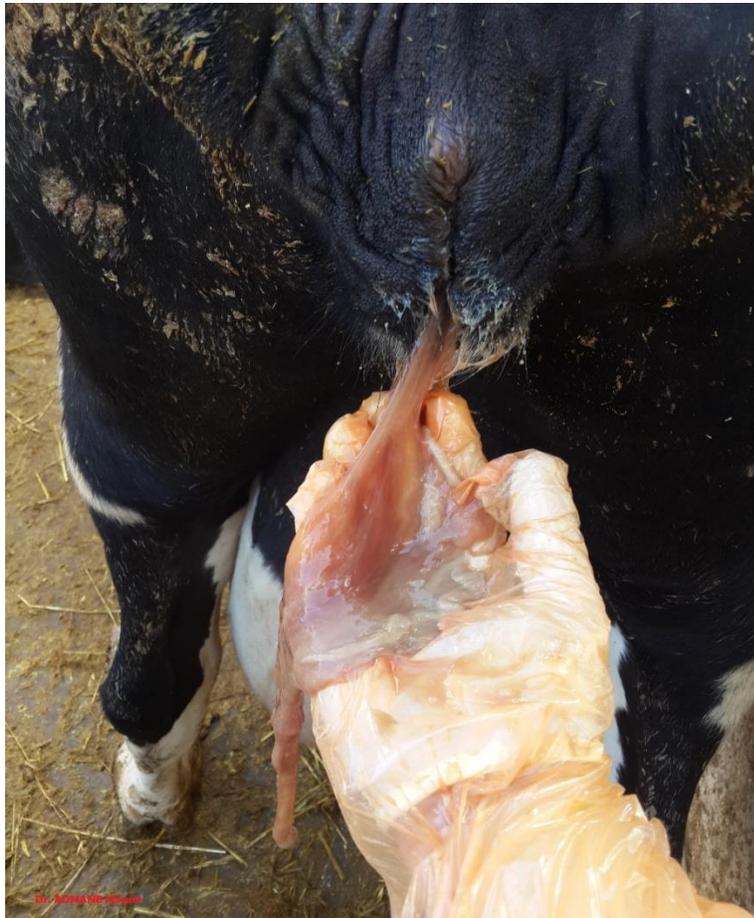


Figure 11 : examen transvaginal mettant en évidence une décharge utérine mucopurulente.

L'interprétation du mucus vaginal est faite selon les scores proposés par Williams et al. [53] et Sheldon et al. [14] comme suit : Un mucus de

- Score 0 : défini par la présence d'un contenu translucide.
- Score 1 : représente un mucus avec des flocons de pus
- Score 2 représente un contenu vaginal de plus de 50 ml de volume et de nature muco-purulente (< 50% de pus).
- Score 3 : défini par une décharge vaginale de nature purulente ou sanguinolente avec un volume de plus de 50ml.

En fonction de la période de diagnostic, la vache est considérée atteinte d'endométrite clinique si son contenu vaginal est de score :

- 3 après 21 JPP [53]
- 2 ou 3 après 26 JPP [53]
- 1 à 3 entre 31 et 59 JPP [15]
- La présence d'une odeur fétide est considérée comme un signe d'endométrite quelle que soit la période postpartum

b) La cytologie utérine

Les prélèvements en vue d'un examen cytologique été réalisés à l'aide d'une cytobrosse à usage humain. Cette dernière a été modifiée pour qu'elle devienne compatible à l'usage chez la vache selon Madoz et al. [15, 86]. Un pistolet d'insémination artificielle a été attaché par sparadrap à une cytobrosse stérile dont la tige est coupée à 8 cm (Cf. Figure 12). Le dispositif ainsi produit est ensuite couvert et protégé de la contamination vaginale à l'aide d'une gaine protectrice d'insémination. Le tout est ensuite enveloppé par un gant de vêlage. Une fois au niveau de l'orifice caudal du col utérin, le gant de vêlage est perforé laissant passer, à travers le col utérin, le dispositif de prélèvement encore protégé par la gaine d'insémination. Au niveau du corps utérin et juste en avant de la bifurcation des cornes, la cytobrosse est poussée en dehors de la gaine de protection tout en la tournant contre la paroi endométriale du corps utérin puis réintroduite à l'intérieur de la gaine de protection.



Figure 12 : Dispositif de prélèvement cytologique constitué d'une cytobrosse à usage humain montée sur un pistolet d'insémination.

Une fois le dispositif extériorisé du vagin, la cytobrosse est détachée du pistolet d'insémination et roulée sur une lame microscopique. Le frottis ainsi produit est immédiatement séché par un fixateur cytologique en aérospray (CytoRal[®], Reactifs RAL, 33650 Martillac, France). Par la suite, le frottis est coloré par MGG à l'aide d'un Kit 555 (Kit RAL 555[®], RAL Diagnostic, 33650 Martillac, France) pour une coloration instantanée.

La lecture des frottis est effectuée à l'aide d'un microscope binoculaire avec 400x et 1000x de magnification. Au minimum, 200 cellules ont été comptées pour déterminer le pourcentage de neutrophiles (PNN). Une cellule est prise en compte si elle appartient à l'un de ces six types : polynucléaires neutrophiles (PNN), polynucléaires éosinophiles (PNE), polynucléaires basophiles (PNB), lymphocytes, monocytes/macrophages et cellules épithéliales (granulaires et aglandulaires)[52] (cf. Figures 13-16).



Figure 13 : Coloration des frottis cytologiques à l'aide d'un kit de MGG modifié à utilisation rapide.

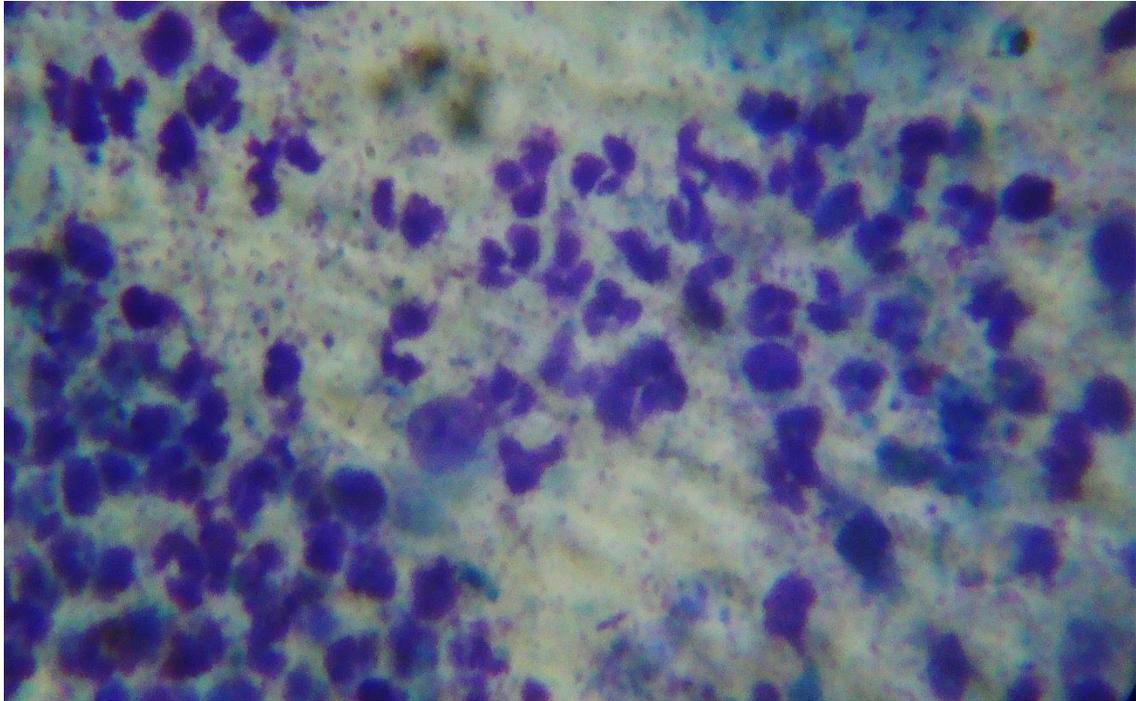


Figure 14 : Examen cytologique d'un frottis utérin, avec présence de polynucléaires neutrophiles.

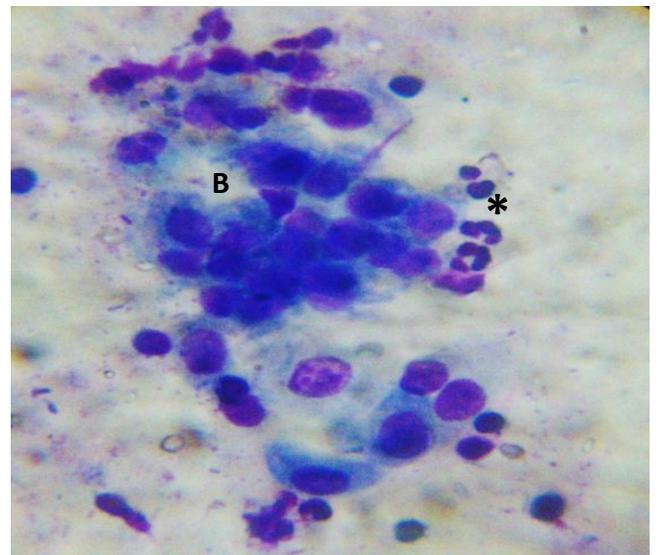
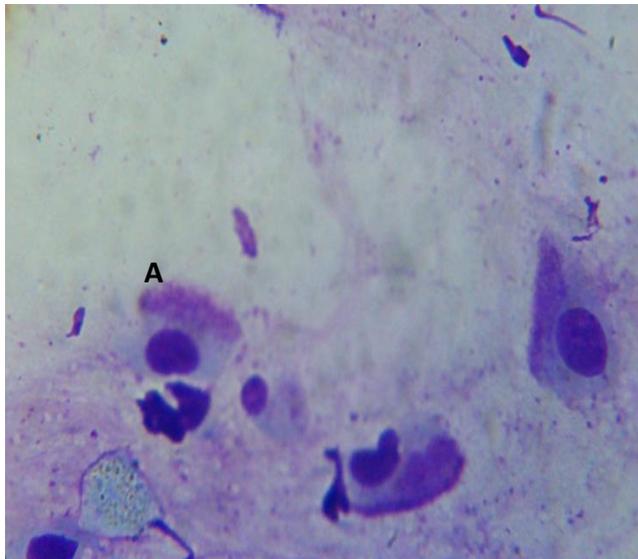


Figure 15 : Examen cytologique de frottis utérins avec présence de cellules épithéliales glandulaires (A) et large amas de cellules épithéliales aglandulaires (B), avec quelques neutrophiles (*).

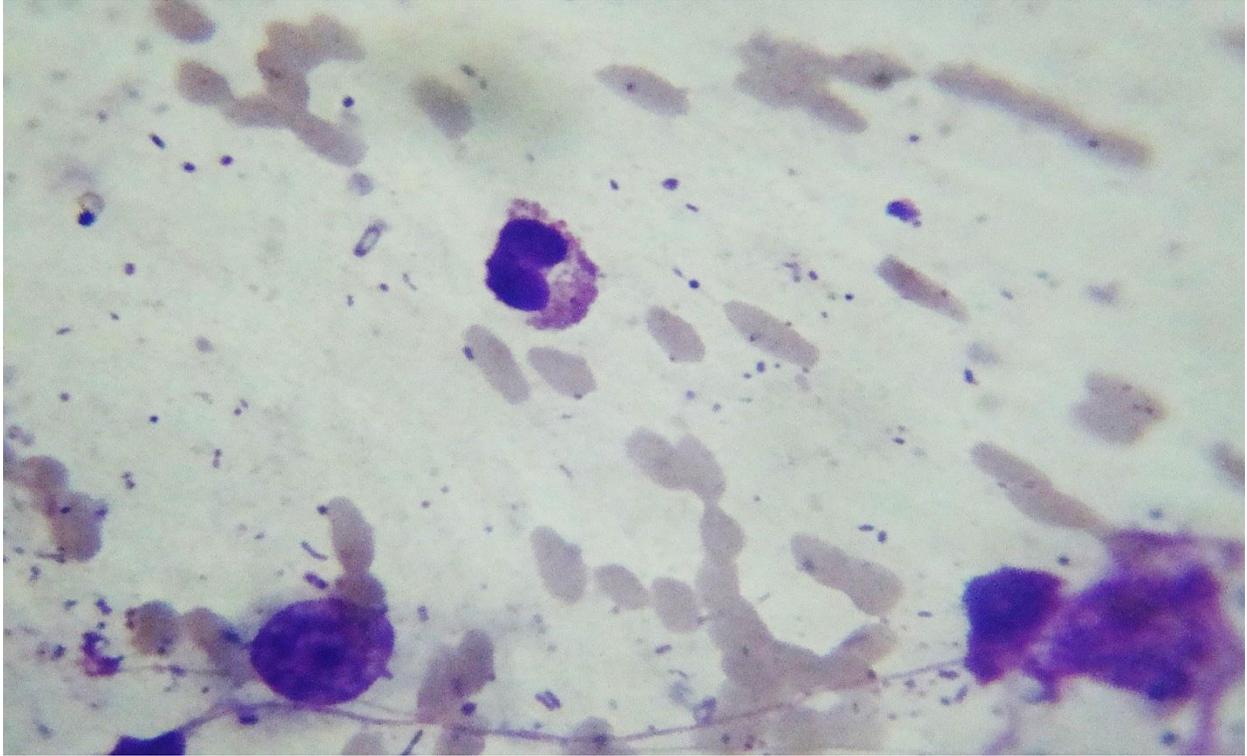


Figure 16 : Examen cytologique d'un frottis utérin avec présence de polynucléaires éosinophile, signe d'une infestation parasitaire.

c) Biopsie utérine

L'examen histopathologique du prélèvement endométrial au moyen d'une pince à biopsie a été réalisé selon le protocole recommandé par Madoz et al [15]. Une main gantée est introduite dans le rectum. Le col de l'utérus est saisi pour faciliter le passage de la pince à biopsie (Titanox®) (Cf. Figure 17). Par voie vaginale, la pince à biopsie est introduit dans l'utérus. Après avoir passé le col utérin, et juste avant la bifurcation des cornes, la mâchoire de l'instrument a été ouvert et à l'aide de la main introduite par voie rectale un fragment de muqueuse est introduit entre les deux mâchoires de la pince à biopsie, pour le couper et le récupérer.



Figure 17 : Examen cytologique d'un frottis utérin avec présence de polynucléaires neutrophiles (N) et cellules épithéliales aglandulaires (E).

Le fragment prélevé est directement placé dans une solution fixatrice à base de formol à 10%, avec un volume de rapport 1 pour 10 [64] et conservé jusqu'au jour de la préparation des coupes histologiques dans le service d'anatomie pathologique de l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger (ENSV).

Les tissus sont ensuite paraffinés et coupés, à l'aide d'un microtome, en coupes de 5 microns d'épaisseur et sur un plan vertical. Les coupes histologiques ainsi produites sont colorées à l'aide de l'hématoxyline de *Hariss* puis en éosine. Chaque lame a été ensuite couverte par une lamelle de protection à l'aide d'une colle histologique Eukitt (O. Kindler GmbH, ZiegelhofstraBe 214. D - 79110 Freiburg).

Chaque lame est examinée au moyen d'un microscope optique binoculaire en vue de mettre en évidence les éventuelles lésions histologiques en relation avec l'endométrite. Ces lésions ont été recherchées avec méthodologie en commençant par observer la lumière utérine puis en progressant vers l'épithélium luminal, le stratum compactum et spongium, les glandes, les vaisseaux pour finir par le myomètre [15, 64, 69, 85].

Du fait qu'il n'y a pas une interprétation universelle pour les coupes histologiques en vue du diagnostic des endométrites chez la vache, nous avons développé une interprétation logique, en collaboration avec Dominique Cassart, personnel scientifique du laboratoire de recherche en pathologie animal, de la faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège.

Dans la présente étude, la vache est considérée atteinte d'endométrite si la coupe histologique de la biopsie utérine présente au moins une des associations des lésions suivantes :

- Absence d'épithélium endométriale associée à une infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongiosum, ou
- Congestion avec un œdème endométrial et une infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongiosum, ou
- Dilatation glandulaire avec infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongiosum, ou
- Rareté glandulaire associée à une fibrose peri-glandulaire et/ périvasculaire, ou
- Lacune lymphatique associée à une fibrose peri-glandulaire et/ périvasculaire ou bien avec infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongiosum.

2.3. Analyse statistique

Les associations entre les variables qualitatives ont été analysées deux à deux à l'aide d'un test de Chi-deux. Les associations entre une variable qualitative et une variable quantitative ont été analysées à l'aide du test de *Student*. Les associations entre les variables quantitatives ont été analysées à l'aide du test de corrélation de Pearson (régression logistique). Un test de Receiver Operating Characteristic (ROC) est utilisé pour calculer le seuil de neutrophile spécifique à notre étude pour interpréter la cytologie utérine [40]. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS version 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp).

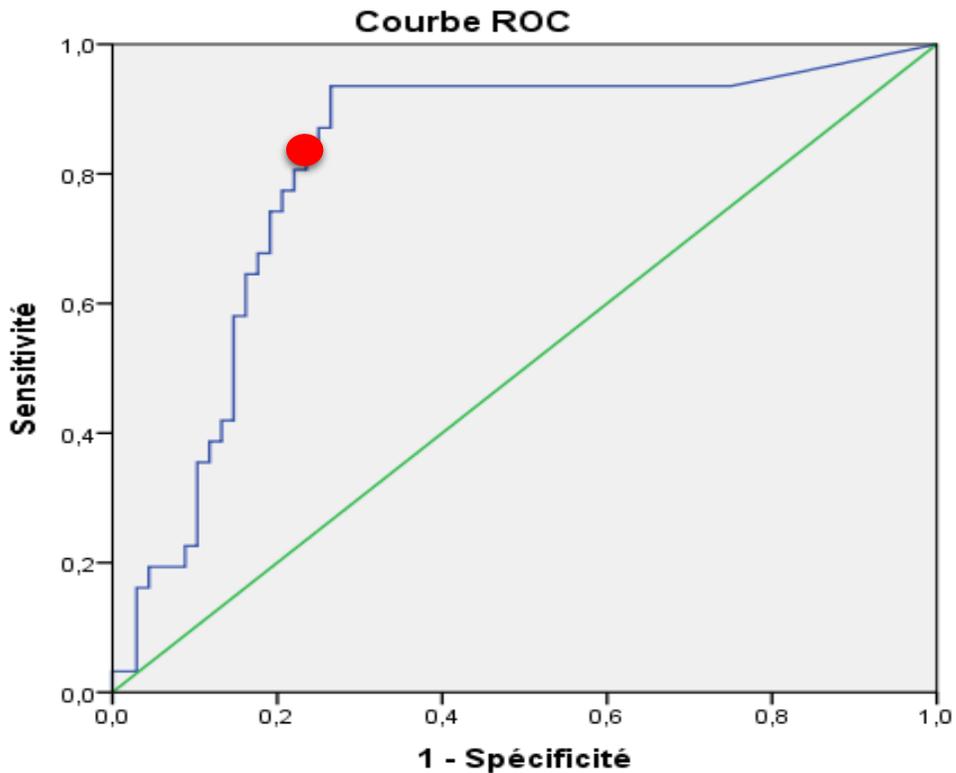
3. Résultats

3.1. Établissement d'un seuil de cytologie utérine positive

Pour donner une grande sensibilité à la cytologie utérine comme une méthode de diagnostic des endométrites notamment la forme subclinique, nous avons choisi le plus faible pourcentage de neutrophile sur les frottis endométriaux à partir duquel il y avait une détérioration des paramètres de la reproduction chez la vache en question. Comme paramètre de reproduction, nous avons choisi la présence ou non d'une gestation à 150 jours après le part.

Ce paramètre a été choisi du fait qu'il résume tous les événements de la période du postpartum, du vêlage jusqu'aux 150 JPP.

A l'aide du test statistique Receiver Operating Characteristic (ROC) [40], nous avons trouvé que le taux de neutrophiles dans les frottis cytologiques de l'utérus au-delà d'un seuil de 9% de PMN avait un effet délétère sur le taux de gestation à 150 JPP (Cf. Figure 18). Ce seuil de neutrophiles représente le point de la courbe de ROC où le rapport sensibilité-spécificité de la cytologie utérine est à son maximum. C'est donc cette valeur de 9% de neutrophiles qu'on va utiliser comme un gold standard pour la méthode de référence pour le diagnostic des endométrites à savoir la cytologie utérine et qui va être comparé avec les autres méthodes de diagnostic.



Les segments diagonaux sont générés par des liaisons.

Figure 18 : Courbe ROC permettant d'établir le taux seuil de neutrophiles entre 21 et 60 JPP chez la vache laitière. Le point rouge représente le point de la courbe où le rapport sensibilité-spécificité est à son maximum, et qui correspond à 9% PMN.

3.2. Prévalence des endométrites

Nous avons classé les endométrites en 4 catégories selon les résultats des méthodes de diagnostic (Cf. Tableau 12) : (1) L'endométrite cytologique, représentée par une cytologie utérine positive, sans prendre en considération les résultats de l'examen vaginal. (2) L'endométrite subclinique, concerne les vaches avec une cytologie utérine positive et un examen vaginal négatif. (3) L'endométrite clinique apparente représentée par un examen du contenu vaginal positif, sans prendre en considération le résultat de l'examen cytologique et (4) l'endométrite clinique réelle est définie par un résultat positif pour l'ensemble de l'examen cytologique et clinique.

Dans cette étude, l'utilisation du terme endométrite clinique par défaut représente l'endométrite clinique réelle. Quel que soit le résultat de l'examen clinique du contenu vaginal, la vache est considérée indemne d'endométrite si le résultat de la cytologie utérine est négatif.

Tableau 12 : Principales définitions utilisées pour classer la forme de l'endométrite.

		Méthode de diagnostic			
		Cytologie utérine		Écoulement vaginal	
		Positive	Négative	Positive	Négative
Endométrite	Cytologique	+		ND	
	Subclinique	+			+
	Clinique				
	Apparente	ND		+	
	Réelle	+		+	
	Indemne		+	ND	

+ : case sélectionnée ; ND : non définie.

3.2.1. Taux des endométrites cytologiques

Parce que nous avons utilisé la cytologie utérine à 9% PNN comme une méthode de référence pour le diagnostic des endométrites, les cas positifs ont été appelés endométrite cytologique. Le taux des endométrites cytologiques entre 21-60 JPP était 41.4% (Cf. Tableau 13).

Tableau 13 : Taux des endométrites

	N	%
Endométrite cytologique	41	41.4%
Endométrite clinique apparente	28	28.3%
Endométrite clinique réelle	22	22.2%
Endométrites subclinique	19	19.2%
Endométrite histologique	38	38.4%
Sans endométrite	58	58.6%

3.2.2. Taux des endométrites subclinique

Le seuil de 9% PMN a été utilisé pour la cytologie utérine afin de diagnostiquer la forme subclinique de l'endométrite. Puisqu'il y avait plusieurs vaches avec un examen cytologique positif associé à un examen positif pour la décharge vaginale, ces vaches ont été classées comme atteintes d'endométrite clinique. Par conséquent, elles ont été exclues du groupe des vaches atteintes par la forme subclinique. De ce fait, Le taux de l'endométrite subclinique durant la période expérimentale 21-60 JPP était 19.2% (Cf. Tableau 13).

3.2.3. Taux des endométrites clinique

Pour différencier les vaches atteintes d'endométrite clinique avec ou sans cytologie utérine positive, les termes endométrite clinique apparente et réelle seront utilisés.

L'endométrite clinique apparente concerne les vaches avec une décharge vaginale positive sans prendre en considération les résultats de la cytologie utérine ; alors que l'endométrite clinique réelle concerne uniquement les vaches avec une décharge vaginale positive associée à une cytologie utérine positive.

En utilisant la cytologie utérine comme méthode de référence pour le diagnostic des endométrites, nous avons trouvé qu'il y avait certaines vaches (n = 6) avec une décharge vaginale positive, mais avec une cytologie utérine négative. Ces animaux ont été considérés comme indemnes d'endométrite. De ce fait, les taux d'endométrite clinique apparente et réelle enregistrées dans la présente étude étaient 28.3% et 22.2%, respectivement (Cf. Tableau 13).

3.2.4. Taux des endométrites histologiques

Pour l'interprétation des lésions histologiques sur les coupes endométriales prélevées par biopsie, nous avons adopté un protocole d'interprétation personnel, pour les raisons déjà citées, en associant deux lésions ou plus pour classer les vaches atteintes d'endométrite ou non. De ce fait, la vache est déclarée atteinte d'endométrite si la coupe histologique présente l'une des combinaisons suivantes :

- Absence d'épithélium endométriale associé à une infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongium.
- Congestion endométriale avec un œdème endométrial et une infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongium.
- Dilatation glandulaire avec infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongium.
- Rareté glandulaire associée à une fibrose peri-glandulaire et/ périvasculaire.
- Lacune lymphatiques associée à une fibrose peri-glandulaire et/ périvasculaire ou bien avec infiltration leucocytaire du stratum compactum et/ou stratum spongium.

En prenant les lésions histologiques indépendamment des résultats des autres méthodes de diagnostic, nous avons trouvé que le taux des endométrites était 38.4%. Parmi ces vaches, 42.1% étaient atteintes d'endométrite clinique et 36.8% d'endométrite subclinique signifiant que 21.1% des vaches avec des lésions histologiques étaient indemnes d'endométrites.

3.3. Comparaison des différentes techniques de diagnostic

3.3.1. Taux des endométrites en fonction des méthodes de diagnostic

La cytologie utérine avec le seuil de PNN 9% a été utilisée comme méthode de référence pour le diagnostic des endométrites durant la période 21-60 JPP. D'après la cytologie utérine le taux des endométrites était 41.4% entre 21-60 JPP. Cependant, nous avons observé une variabilité de taux selon la méthode appliquée (Cf. Figure 19).

En utilisant une seule méthode de diagnostic, la fréquence des endométrites enregistrée par la cytologie utérine à l'aide de cytobrosse était la plus élevée (41.4%) alors que l'examen de

la décharge vaginal a donné le taux la plus basse (28.3%). La biopsie utérine a donné des résultats intermédiaires entre les deux autres méthodes de diagnostic (38.4%).

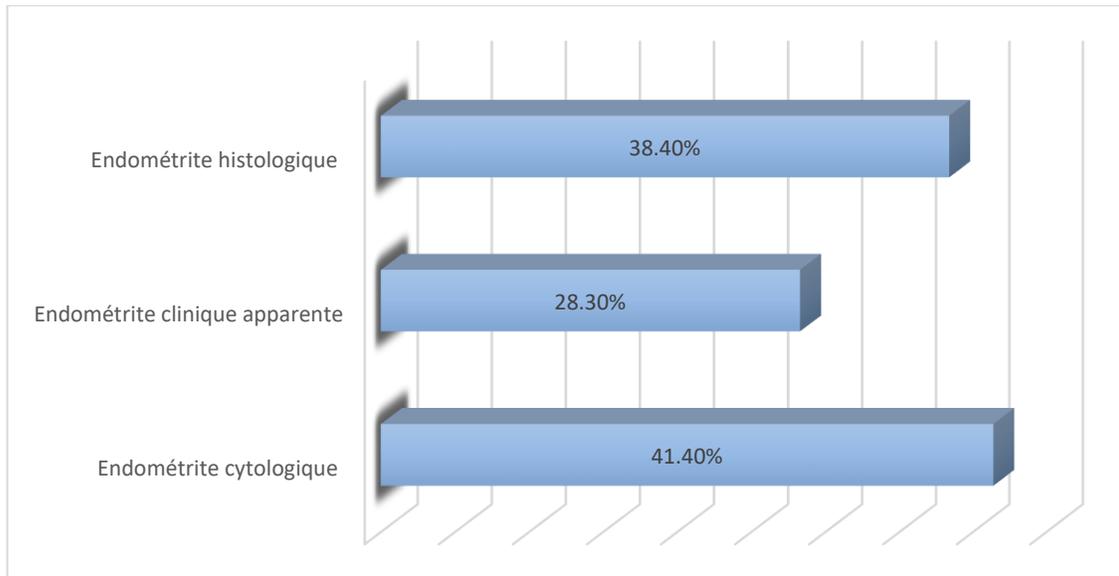


Figure 19: Fréquence des endométrites en fonction des méthodes de diagnostic

3.3.2. Exactitude et fiabilité des méthodes de diagnostic des endométrites

Pour choisir la meilleure technique de diagnostic, de point de vue facilité de mises en œuvres et exactitude de ses résultats, nous avons testé pour chacune si la présence d'une endométrite cytologique influait sur le résultat fourni par la technique. Les méthodes de diagnostic influencées doivent avoir un $P < 0.05$ (Cf. Tableau 14).

Tableau 14 : Exactitude et fiabilité des différents des méthodes de diagnostic des endométrites (la cytologie utérine a été utilisée comme diagnostic de référence).

Technique	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Fiabilité positive (%)	Fiabilité négative (%)	P
Examen du contenu vaginal	54	90	79	73	< 0.01
Biopsie utérine	73	86	79	82	< 0.01

Nos résultats ont montré que l'examen du contenu vaginal à l'aide d'une main gantée et la biopsie utérine sont deux méthodes de diagnostic d'endométrite significativement influencées par la présence ou l'absence d'une endométrite ($P < 0.01$).

Cependant, les vaches dont le contenu vaginal est positif n'ont pas systématiquement développées une endométrite (90%), et la capacité de ce test à détecter les endométrites est médiocre (54%). En revanche, son aptitude à fournir une réponse négative est assez élevée (100%). Trois quarts des vaches dont le contenu vaginal est clair n'ont effectivement pas d'endométrite (73%). Pour la biopsie utérine les différentes variables d'exactitude et de fiabilité sont très proches et sont assez bonnes.

4. Discussion

4.1. Seuil de la cytologie utérine

En utilisant la cytologie utérine pour le diagnostic des endométrites entre 21-60 JPP, nous avons trouvé que le pourcentage des neutrophiles varie entre 0 et 96.6% avec une moyenne de 13.2%. Salasel et al. [8] ont diagnostiqué l'endométrite subclinique chez les repeat breeder aux 190±40 JPP en utilisant la cytologie utérine. Ils ont trouvé que la moyenne de pourcentage de neutrophile était de 3.1% avec un minimum et un maximum de 0 et 9%, respectivement.

Dans la présente étude nous avons trouvé qu'à partir de 9% de PNN le taux de gestation à 150 JPP est significativement affecté. De ce fait, nous avons considéré ce seuil de 9% comme un seuil d'interprétation de la cytologie utérine pour classer les vaches comme indemnes ou atteintes d'endométrite. Notre seuil de PMN est supérieure au 6% reporté par Deguillium [42] après 35 JPP mais inférieure au 17% reporté par Dizien [249] durant 21-60 JPP en utilisant le taux de réussite à la première insémination pour comparer les vaches saines et celles atteintes d'endométrite.

En adoptant un seuil de 9% PNN nous avons trouvé que la moyenne de pourcentage de neutrophiles chez les vaches atteintes d'endométrite était de 28.4% [9.1-96.6%] contre 2.4% [0-8.7%] chez les vaches indemnes. Selon Bacha et Regassa [24], en adoptant un seuil de 5%PNN le taux de neutrophiles trouvé variait entre 6.3 et 9% chez les vaches avec endométrite subclinique et entre 1.1 et 3.1% chez les vaches indemnes d'endométrite subclinique.

Dans la présente étude, la moyenne de pourcentage des neutrophiles était de 2.4, 21, 34.8% chez les vaches saines, atteintes d'endométrite subclinique et clinique, respectivement.

Ces résultats sont très proches aux 3.03 ± 1.37 , 13.67 ± 5.09 et 30.83 ± 6.07 reportés par Johnson et al. [97] chez les vaches indemnes, atteintes d'endométrite subclinique et clinique, respectivement.

4.1. Taux des endométrites

4.1.1. Taux des endométrites cytologique

La cytologie utérine a été utilisée comme une méthode de référence pour le diagnostic des endométrites entre les 21^{ème} et 60^{ème} jours postpartum chez les vaches laitières en Algérie. L'interprétation des prélèvements cytologiques a été faite en adoptant un seuil de 9% de neutrophiles. Les vaches avec un taux de PNN $\geq 9\%$ ont été qualifiées comme atteintes d'endométrite cytologique.

Durant la présente étude, le taux totale de l'endométrite cytologique entre 21-60 JPP était 41.4%, très proche au 40% reporté par Yasui et al. [250] en adoptant un seuil de 10% PMN pour le diagnostic des endométrites cytologiques entre 40-60 JPP, utilisant un lavage utérin comme moyen de prélèvement cytologique.

Galvão et al. [96], ont rapporté une prévalence de 47% d'endométrite cytologique en utilisant le lavage utérin et en adoptant des seuils cytologiques différents selon la période du prélèvement (8.5, 6.5 et 4% PNN au 21, 35 et 49 JPP, respectivement). En revanche, notre résultat est inférieur au 53% reporté par Salasel et al. [8] et Gilbert et al. [3] entre 190 \pm 40 JPP et 40-60 JPP, respectivement.

Madoz et al. [86] ont adoptés différents seuils d'interprétation selon la période du postpartum et ont enregistré, entre 21-60 JPP une prévalence d'endométrite de 19% qui est inférieure à celle trouvé dans notre enquête. Cette différence peut être expliquée par le fait que Madoz et al. [86] ont exclus les vaches avec endométrite clinique de l'étude expérimentale. Dans notre étude, le taux des endométrites cytologiques était élevée parce qu'elle regroupe les deux formes d'endométrite, clinique et subclinique. Debuc et al. [129], en adoptant un seuil de 6% à 35 JPP ont enregistré une prévalence d'endométrite cytologique de 18%.

Kasimanickam et al. [40] ont enregistré une prévalence d'endométrite cytologique de 35% durant la période de 20-33 JPP, et 34% entre 34-47 JPP en utilisant des seuils plus élevés ; 18% et 10% de PMN, respectivement ce qui explique les faibles prévalences par rapport à nos résultats. En revanche, Prunner et al. [33] ont trouvé une prévalence d'endométrite cytologique de 21% entre 20-30 JPP en adoptant un seuil de 5% PMN. Cette faible prévalence par rapport à la nôtre peut être expliquée par le fait que Prunner et al. [33] ont travaillé sur une courte période qui correspond à la moitié de notre période de suivi (21-60 JPP).

4.1.2. Taux des endométrites subcliniques

La présente étude représente un premier travail expérimental concernant une enquête sur le taux des endométrites subcliniques chez la vache laitière dans les élevages algériens. La cytologie utérine a été utilisée pour le diagnostic des endométrites subcliniques et les lames sont interprétées en fonction du pourcentage des PMN. En étudiant la corrélation entre le taux des PMN et le taux de gestation à 150 JPP, nous avons trouvé que ce paramètre de reproduction est altéré dès que le taux des PMN atteint ou dépasse un seuil de 9%. Ce seuil est utilisé pour différencier les vaches atteintes d'endométrite des vaches indemnes.

Parmi les vaches avec une cytologie utérine positive (PMN \geq 9%), 22/41 avaient une décharge vaginale positive et qualifiées d'atteintes d'endométrite clinique réelle. De ce fait, le taux des endométrites subcliniques qui concerne les vaches avec une cytologie utérine positive associée à une absence d'une décharge vaginale positive était de 19.2% (n=19/99) entre 21-60 JPP.

Notre taux est identique à celle trouvée par Dubuc et al. [28] entre 32-38 JPP en adoptant un seuil de 6% PMN. Plöntzke et al. [57], en utilisant un seuil de 5% PMN durant 32-52 JPP ont trouvé une prévalence identique à celle trouvée dans notre étude.

Notre résultat est proche au 17.8% reporté par Madoz et al. [86] en adoptant 3 seuils différents de PMN en fonction de la période de postpartum entre 21-62 JPP. Lima et al. [92] et Carneiro et al. [91] ont enregistré une prévalence d'endométrite subclinique de 23.5% et 26% durant 25 \pm 3 JPP et 32-72 JPP, respectivement en adoptant un seuil de 5% PMN.

Kasimanickam et al. [40] ont trouvé des prévalences de l'ordre de 35.1% et 34% durant 20-33 JPP et 34-47 JPP en adoptant des seuils de 18% et 10% PMN, respectivement ce qui est supérieure au 19.2% reportée dans notre étude. De même, Galvão et al. [96] ont enregistré une prévalence de 47% durant 21-49 JPP en adoptant des seuils variant entre 4 et 8.5% PMN en fonction de la période de postpartum.

Salasel et al. [8] and Gilbert et al. [3] ont trouvé une prévalence d'endométrite subclinique de 53% durant 190±40 JPP and 40-60 JPP, respectivement. Plöntzke et al. [57] ont enregistré une prévalence de 38% en utilisant un seuil de 5% PMN durant 18-38 JPP.

4.1.3. Taux des endométrites cliniques

L'examen de la décharge vaginale en utilisant une main gantée a été utilisé pour le diagnostic de la forme clinique des endométrites. L'interprétation des résultats a été faite selon les scores proposés par Williams et al [53] et Madoz et al [15]. Parmi les 99 vaches 28 vaches (28.3%) avaient une décharge vaginale positive et classées comme atteintes d'endométrite clinique apparente. En examinant la cytologie utérine de ces vaches présentées une cytologie positive et les 6 autres une cytologie négative. Ces dernières ont été classées comme non atteintes d'endométrite du fait que la cytologie utérine a été utilisée comme méthode de référence pour le diagnostic des endométrites. De ce fait, le taux des endométrites cliniques réelles chez les vaches avec une décharge vaginale et cytologie utérine positives était 22.2%.

En examinant le contenu vaginal, Madoz et al. [15] (en utilisant la main gantée) et Prunner et al. [33] (en utilisant un vaginoscope), ont rapporté une prévalence apparente d'endométrite clinique de 27,3% entre 21-62 JPP et de 28,3% entre 20-30 JPP, respectivement similaires à ceux rapportées dans notre étude.

Prunner et al. [33] ont constaté que la proportion des neutrophiles était peu corrélée avec les résultats de l'examen clinique à l'aide d'un vaginoscope ($r = 0.22$; $P < 0.001$). Dubuc et al [28] en utilisant la cytologie utérine pour le diagnostic des endométrites durant la période 35 ± 3 JPP et 56 ± 3 JPP, ont trouvé que parmi les vaches atteintes d'endométrite clinique 62% et 64% avaient une cytologie utérine négative, respectivement. Madoz et al [15] ont trouvé que 31% des

vaches (5/16 vaches) atteintes d'endomérites cliniques avaient une cytologie utérine négative, un taux élevé par rapport au 21.4% (6/28 vaches) enregistré dans notre étude.

Westermann et al. [251], on observé que la présence des bactéries aérobiques au niveau de l'utérus était associée à un taux de neutrophiles supérieure à 5%. Ces chercheurs ont trouvé que 17.3% des endomérites cliniques diagnostiquées par examen vaginoscopique était des faux positifs, ce qui est proche au 21.4% enregistré dans notre étude. Prunner et al. [34] ont enregistré une prévalence d'endomérite clinique de 58.4% au 21^{ème} jour postpartum en utilisant un vaginoscope pour la mise en évidence des écoulements vaginaux.

Kaufmann et al. [252] ont enregistré une prévalence d'endomérite clinique apparente de 18.7% durant la 5^{ème} semaine du postpartum. Alors que Pleticha et al. [48] ont trouvé une prévalence de 36.8% en utilisant l'examen de la décharge vaginale à l'aide d'une main gantée entre 21-27^{ème} JPP. Kasimanickam et al. [222] en diagnostiquant des vaches durant les 28-35 JPP ont trouvé une prévalence d'endomérite clinique apparente de 40% qui est supérieure à la nôtre.

Dans la présente étude les vaches qui avaient une cytologie utérine négative associée à une décharge vaginale positive ont été considérées comme atteintes de vaginite mais pas d'endomérite. Dubuc et al. [28] confirment cette constatation indirectement en déclarant que l'endomérite clinique (décharge vaginale positive) et l'endomérite cytologique (cytologie utérine positive) représentent des pathologies différentes du tractus génital de la vache.

4.1.4. Taux des endomérites histologiques

Le diagnostic des pathologies utérines en utilisant la technique de biopsie est utilisée depuis très longtemps chez la jument [62-68]. L'importance de cette technique de diagnostic a incité les chercheurs à l'adapter pour qu'elle devienne compatible chez la vache du fait qu'elle offre des informations précieuses sur l'état inflammatoire ainsi que les différentes lésions tissulaires au niveau de différentes couches tissulaires de l'utérus [4, 15, 29, 59, 69-72].

Dans la présente étude nous avons adopté des critères lésionnels spécifiques à notre étude. Ces critères ont été choisis selon laquelle au moins une lésion est théoriquement considérée comme un signe d'inflammation et l'association d'au moins deux lésions représentent une

altération de l'intégrée tissulaire qui peut affecter le bon fonctionnement de la partie touchée. Des photos des lésions tissulaires sont présentées dans l'annexe I. Nous avons enregistré un taux d'endométrite de 38.4% qui est proche au 41.4% pour la méthode de référence (cytologie utérine) bien que la différence soit statistiquement significative ($P < 0.01$).

Chapwanya et al. [72] ont trouvé que 23.1% des vaches avaient une biopsie utérine indiquant une inflammation légère aux 30 et 60 JPP, et toutes ces vaches avaient un échec d'insémination pouvant indiquer une corrélation entre les lésions histologiques de l'endomètre et l'altération des performances de la reproduction.

4.2. Comparaison des différentes techniques de diagnostic

4.2.1. Comparaison entre la cytologie et la biopsie utérine

Le présent travail représente la première étude expérimentale qui teste la corrélation entre les résultats de la cytologie et la biopsie utérines dans les conditions de l'élevage en Algérie. Nous avons trouvé un niveau de concordance modéré entre les deux techniques de diagnostic ($Kappa = 0.6$). Il semble que la biopsie utérine offre des informations détaillées sur l'état inflammatoire des tissus utérins chez la vache [59]. Contrairement à la cytologie utérine qui permet la mise en évidence de la réaction inflammatoire au niveau de la couche superficielle de l'endomètre, la biopsie utérine permet d'évaluer l'état inflammatoire et l'infiltration leucocytaire ainsi que les déformations et les lésions histologiques au niveau de différentes couches tissulaires de l'utérus [15].

Cependant, à la différence de la cytologie, les résultats de la biopsie utérine peuvent être influencés par le stade du cycle oestral de la vache au moment du prélèvement [15, 86, 253].

En utilisant la cytologie utérine avec un seuil de 9% PMN comme une méthode de référence, nous avons trouvé que la biopsie utérine donne une sensibilité et spécificité de 73% et 86%, respectivement. Nos résultats d'exactitude de la biopsie utérine sont proches aux 78% et 81% de sensibilité et de spécificité enregistrés par Meira et al. [59] pour la meilleure combinaison pour les critères de diagnostic histologique qui regroupe l'état inflammatoire de l'épithélium, lamina propria et des vaisseaux sanguins. Pour tous critères confondus, les mêmes auteurs ont trouvé que la biopsie utérine avait une sensibilité et spécificité de 44% et 92% respectivement et

un coefficient de concordance Kappa = 0.4 en la comparant à la cytologie utérine en vue de diagnostiquer les endométrites subcliniques entre 21-47 JPP [59]. Dans le même contexte, Madoz et al. [15] ont enregistré une faible concordance entre ces deux techniques avec un Kappa de 0.1 ($P = 0.27$).

Selon nos résultats, bien que la différence soit statistiquement significative la biopsie utérine donne des résultats proches à ceux de la cytologie utérine. Madoz et al. [15] ont constaté que les chances d'avoir une biopsie utérine négative sont plus importantes chez les vaches saines que celles atteintes d'endométrite subclinique (OR ajustée = 13.145, 95% IC = 2.9 – 58.9; $P < 0.001$). De plus, les chances d'avoir une biopsie utérine négative décroissent de 2.1% ($P = 0.03$) pour chaque augmentation d'un % de PMN [15]. De ce fait, la biopsie utérine pourrait être utilisée comme une méthode de diagnostic des endométrites chez la vache comme il a été rapporté chez la jument [254].

Parmi les vaches indemnes d'endométrite nous avons trouvé que 13.8% ($n = 8/58$) avaient une biopsie utérine positive. Madoz et al. [15] ont trouvé que 59.3% ($n = 16/27$) des vaches indemnes d'endométrite cytologique avaient une biopsie utérine positive. En revanche et selon les mêmes auteurs, toutes les vaches atteintes d'endométrite cytologique avaient des biopsies utérines positives. Cela peut être dû aux modifications histologiques de l'utérus en relation avec le cycle œstral comme il a été confirmé par Studer and Morrow [253]. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse du fait que nous n'avons pas fait un examen détaillé pour les structures ovariennes chez ces vaches.

4.2.2. Comparaison entre le diagnostic clinique et la cytologie utérine

En utilisant la cytologie utérine avec un seuil de 9% PNN comme une méthode de référence, nous avons trouvé que l'examen du contenu vaginal en utilisant une main gantée donne une sensibilité et spécificité de 54% et 90%, respectivement. Il était étonnant de trouver que 21.4% ($n = 6/28$) des vaches avec une endométrite clinique étaient indemnes d'endométrite cytologique selon la cytologie utérine. Dans une étude récente, Madoz et al. [15] ont trouvé aussi que 31.2% ($5/16$) des vaches atteintes d'endométrite clinique avaient une cytologie utérine négative. Dans le même contexte, Dubuc et al. [28] en utilisant la cytologie utérine pour le diagnostic des

endométrites durant les périodes : 35 ± 3 JPP et 56 ± 3 JPP ont trouvé que parmi les vaches atteintes d'endométrite clinique 62% et 64% avaient une cytologie utérine négative, respectivement. De ce fait ces auteurs considèrent que l'endométrite clinique et l'endométrite cytologique représentent des pathologies différentes et doivent être diagnostiquées de façon différente [28]. Dans notre étude, nous considérons les vaches avec une décharge vaginale positive et une cytologie utérine négative comme atteintes de vaginite et indemnes d'endométrite. Cette hypothèse nécessite une confirmation dans des études ultérieures avec l'association de la cytologie vaginale et cervicale à la cytologie utérine dans le suivi sanitaire de l'appareil génital chez la vache.

Pour Westermann et al. [251] la présence des bactéries aérobiques au niveau de l'utérus avec un taux de neutrophiles supérieure à 5% est un signe d'endométrite. Ils ont trouvé que 17.3% des endométrites cliniques diagnostiquées par examen vaginoscopique était des faux positifs, ce qui est proche au 21.4% enregistré dans notre étude. De ce fait, l'endométrite clinique peut être confondue avec la vaginite si le diagnostic est basé uniquement sur l'examen clinique de la décharge vaginale, et de ce fait nous pouvons confirmer que la présence du pus dans le vagin n'est pas toujours représentative de l'état inflammatoire de l'utérus.

4.2. 3. Comparaison entre le diagnostic clinique et la biopsie utérine

Nous avons trouvé dans la présente étude que 27.3% ($n = 6/22$) des vaches qui avaient un écoulement vaginal positif avaient une biopsie utérine négative. Madoz et al. [15] par contre ont trouvé que toutes les vaches atteintes d'endométrite clinique avaient aussi une biopsie utérine positive.

Pour notre résultat, il peut s'agir d'une faible inflammation ou une inflammation très récente qui n'a pas encore modifié la structure tissulaire de l'endomètre et, de ce fait, donne une biopsie utérine négative.

5. Conclusion

L'existence de l'endométrite subclinique a incité les scientifiques à développer et adapter des nouvelles techniques de diagnostic qui permet de mettre en évidence la réaction

inflammatoire au niveau de l'utérus à n'importe quel stade du postpartum et surtout d'avoir une bonne exactitude et fiabilité.

Le seuil de neutrophiles trouvé dans notre étude (9%) était proche à ceux reportés dans la littérature, bien que souvent la période de leur diagnostic était inférieure à celle de notre étude (21-6-JPP). En revanche, notre seuil de PNN a confirmé une forte corrélation avec la présence d'endométrite et l'altération de taux de gestation à 150 JPP.

Il était clair que la technique de diagnostic la plus utilisée par les praticiens de la santé animale dans le terrain algérien, à savoir l'examen du contenu vaginal à l'aide d'une main gantée ne permet de mettre en évidence que la forme clinique de la maladie. De ce fait un grand nombre de vaches subcliniquement infectées sont inséminées mais reste toujours ou pour longtemps non gravides. En plus, l'examen du contenu vaginal ne permet pas de différencier entre vaginite et endométrite comme nous avons trouvé que 21.4% des vaches avec une décharge vaginale positive avaient une cytologie utérine inférieure à 9%. Bien que la biopsie utérine reste une nouvelle technique et appliquée pour la première fois dans le diagnostic des endométrites chez la vache laitière en Algérie, elle a prouvé qu'elle donne des bons résultats et même proches à ceux de la cytologie utérine ($P < 0.01$) si elles sont appliquées entre 21-60 jours après le part.

CHAPITRE 2 : FACTEURS DE RISQUE DES ENDOMETRITES

1. Introduction

La gravité d'une endométrite peu s'échelonner d'une infection subclinique à une maladie déclarée avec baisse de la fertilité, temporaire ou permanente, et même, dans certains cas, à la mort de l'animal. La détermination de sa fréquence reflète non seulement la santé utérine mais aussi de l'animal en particulier et de la santé économique de l'exploitation en général.

La connaissance et la quantification des facteurs de risques spécifiques à chaque région dans les élevages laitiers en Algérie constituent donc pour nous, un objectif préliminaire essentiel dans la mise en place d'une méthode d'approche thérapeutique curative ou préventive efficace.

L'objectif de cette partie de l'étude, est la détermination des facteurs de risque spécifiques à chaque forme d'endométrite, dans un échantillon des élevages Algériens.

2. Matériel et méthodes

a. Échantillon de l'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée sur les mêmes vaches que celles qui sont étudiées, dans le premier chapitre. Quarante-neuf (99) vaches laitières de race Prim-Holstein (n = 73) et Montbéliarde (n = 26) en période de postpartum (21 à 60 JPP), appartenant à 14 élevages laitiers, ont été utilisés pour cette étude. Les endométrites ont été diagnostiquées par l'examen manuel du contenu vaginal et par cytologie.

2.1. Méthodes de diagnostic pratiquées

a) Examen vaginal

L'examen du contenu vaginal a été réalisé comme précédemment décrit dans le premier chapitre, selon le protocole de Pleticha et al. [48] et Plöntzke et al [248]. L'interprétation du mucus vaginal est faite selon les scores proposés par Williams et al. [53] et Sheldon et al. [14].

b) Cytologie utérine

Les prélèvements de la cytologie endométriale ont été réalisés à l'aide d'une cytobrosse selon la technique détaillée dans le premier chapitre, selon Madoz et al. [15, 86].

2.2. Facteurs de risque

L'endométrite sous ses deux formes, clinique et subclinique est considérée comme une maladie multifactorielle dont plusieurs facteurs peuvent influencer son installation chez la vache laitière, et chaque facteur peut être spécifique à une forme d'endométrite. Vingt et un facteurs ont été enregistrés pour être analysés statistiquement comme mentionnés ci-après :

- | | | |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1. Race | 2. Sexe du veau | 3. Métrite |
| 4. Numéro de lactation | 5. Production laitière | 6. Rétention placentaire |
| 7. Saison de vêlage | 8. Hypocalcémie | 9. BCS |
| 10. Assistance au vêlage | 11. Cétose | 12. Propreté de la vache |
| 13. Césarienne | 14. Acidose | 15. Durée de gestation |
| 16. Gestation gémellaire | 17. Déplacement de la caillette | 18. Induction de vêlage |
| 19. Mortinatalité | 20. Mammite | 21. Angle de la vulve |

Dans la présente étude expérimentale, les différents facteurs de risque ont été identifiés en adoptant les définitions suivantes :

- Rétention placentaire : définie par la persistance des membranes fœtales au-delà de 24h suivant le part [118].
- Dystocies : englobent l'assistance de vêlage et la césarienne [9].
- Durée de gestation : période supérieure ou inférieure à 270 jours.
- Induction du vêlage : hormonal ou médicamenteux.
- Déplacement de la caillette : diagnostiqué par la mise en évidence d'un son « Ping » à l'auscultation abdominale [19, 118].
- Hypocalcémie clinique: définie par la présence des symptômes suivants : faiblesse, peau froide, réponse favorable la perfusion du calcium [19, 118].
- Cétose clinique : définie par la présence des symptômes suivants : anorexie, dépression, odeur d'acétone (odeur de pomme reinette) dans l'haleine [19, 118].
- Métrite : définie par un utérus élargi et une décharge vaginale fétide, associés (puerpérale) ou non (clinique) à des signes systémiques de l'infection et parfois des signes de toxémie, détectable dans les 21 jours qui suivent le part [12, 14].
- BCS : évalué selon les scores proposés par Edmondson et al. [255] avec une échelle de 0.5 point avec un minimum de 0 et de maximum de 5 (Cf. Figure 20).
- Souillure de l'arrière-train : évaluée selon Faye et Barnouin [256] en devisant le train postérieur en 5 zones anatomiques (Cf. Figure 21). L'évaluation de l'état de propreté de chaque zone anatomique se fait par des scores de 0 à 2 avec une échelle de 0 .5 (Cf. Figure 22).

Note de condition corporelle	Coupe transversale de l'épine dorsale (vertèbres lombaires)	Vue arrière (coupe) des hanches	Vue latérale de la ligne entre l'ischion et la hanche (apophyse transverse)	Cavité entre l'attache de la queue et l'ischion	
				Vue arrière	Vue de profil
1. Vache très maigre					
2. Ossature évidente					
3. Ossature et couverture bien proportionnées					
4. L'ossature se perd dans la couverture tissulaire					
5. Vache grasse					

Figure 20: Grille d'évaluation de la condition corporelle (BCS) [255] (adapté).

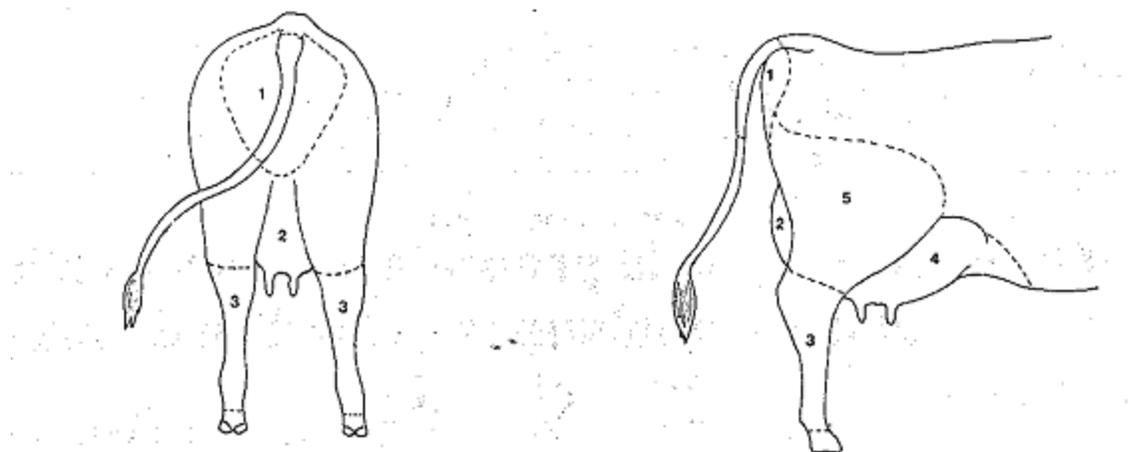


Figure 21: Zones anatomiques à considérer pour la notation de l'état de propreté des vaches. 1 ; région ano-génitale ; 2 : mamelle vue arrière ; 3 : région du pied-jarret ; 4 : mamelle vue coté ; 5 : cuisse [256].

Le score total des 5 régions anatomiques est utilisé pour refléter l'état de propreté de la stabulation comme suite :

- Stabulation très propre : 0 - <2.
- Stabulation propre : 2- <4.
- Stabulation un peu sale : 4 - <6.
- Stabulation sale : 6 - <8.
- Stabulation très sale : 8 - <10.

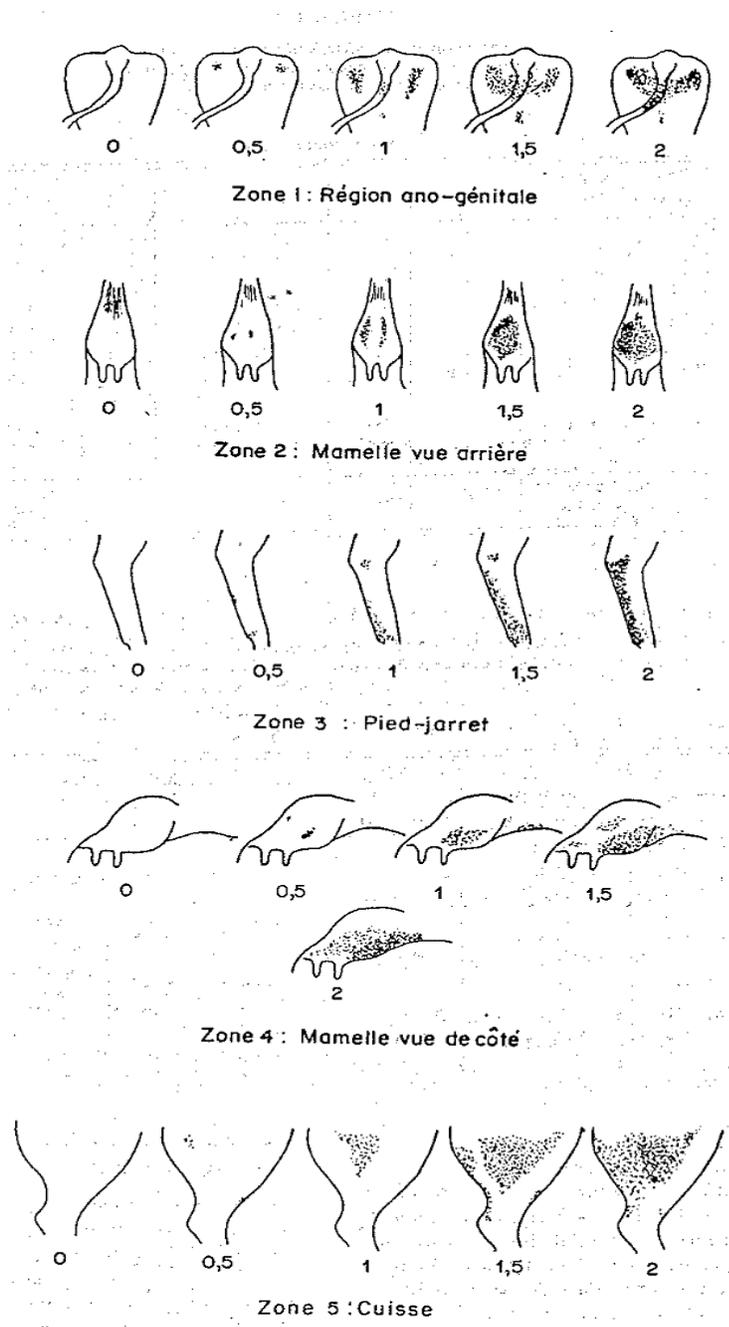


Figure 22: Critères de notation de l'état de propreté des différentes régions anatomiques [256]. 0 : pas de souillures ; 0,5 : quelques souillures peu étendues ; 1 : souillures étendues représentant <50% de la zone considérée ; 1,5 : souillures étendues à >50% de la zone considérée ; 2 : zone totalement souillée ou recouverte d'une croûte épaisse.

2.3. Collecte et saisie des données

2.3.1. Collecte des données

Toutes les informations collectées durant la partie expérimentale ont été portées sur place sur un questionnaire individuel pour chaque vache (Cf. Annexe II). Tous les questionnaires ont été remplis par la même personne.

2.3.2. Codage et saisie des données

Toutes les informations qui se trouvent sur les questionnaires ont été recopiées sous format informatique à l'aide du logiciel Excel (Excel®, Microsoft Corporation, 2013). Pour faciliter l'étude statistique et l'interprétation, certaines variables ont été codifiées de façon dichotomique ou numérique (Cf. Tableau 15).

Tableau 15 : Liste des variables enregistrés

Variable	Codification
Éleveur	Numéro de la ferme d'élevage
Numéro	Numéro de travail de la vache
Race	1 : Prime-Holstein 2 : Montbéliard
Date examen	Date de l'examen
Date vêlage	Date du dernier vêlage
Date insémination	Date de la dernière insémination fécondante
Jour postpartum	Intervalle vêlage - examen (jours)
Numéro lactation	Numéro de lactation 1 : première lactation 2 : deuxième lactation 3 : troisième lactation 4 : quatrième lactation
Production laitière	Production journalière du lait (Kg)
Saison vêlage	0 : vêlage en printemps 1 : vêlage en automne 2 : vêlage en hiver 3 : vêlage en été
Rétention placentaire	0 : absence de rétention placentaire dans les 24h du postpartum (PP). 1 : présence de rétention placentaire dans les 24h PP.

Assistance vêlage	0 : vêlage sans assistance extrinsèque par le personnel 1 : vêlage avec assistance par le personnel
Césarienne	0 : vêlage par voie naturelle 1 : vêlage avec césarienne
Durée gestation	Intervalle insémination fécondante - vêlage (jours)
Induction vêlage	0 : vêlage spontané 1 : vêlage induit par le vétérinaire
Nombre veaux	1 : vêlage d'un seul veau 2 : vêlage de jumeaux
Sexe veau	0 : vêlage d'un veau femelle 1 : vêlage d'un veau male 2 : faux jumeaux mâle et femelle.
Mortinatalité	0 : naissance d'un veau viable 1 : naissance d'un veau mort ou décédé dans les 48h PP.
Déplacement caillette	0 : absence de déplacement de la caillette après vêlage 1 : présence de déplacement de la caillette après vêlage
Hypocalcémie	0 : absence d'hypocalcémie clinique après vêlage 1 : présence d'hypocalcémie clinique après vêlage
Cétose	0 : absence de cétose après vêlage 1 : présence de cétose après vêlage
Métrite	0 : absence de métrite dans les 21jours PP 1 : présence de métrite dans les 21jours PP
Mammite	0 : absence de mammite clinique après vêlage 1 : présence de mammite clinique après vêlage
BCS	Score corporel avec échelle de 0,5
Souillure vache	Souillure de l'arrière train de la vache
Angle vulve	0 : vulve forme un ange > 70° avec la ligne horizontale 1 : vulve forme un ange < 70° avec la ligne horizontale
Température	Température rectale (en °C)
Ovaire gauche /Droite	Les structures présentes sur l'ovaire suite à une palpation transrectale : 0 : ovaire lisse 1 : présence d'un follicule 2 : présence de CJ 3 : présence de kyste folliculaire
Aspect décharge	Score visuel de l'écoulement vaginale 0 : translucide 1 : avec quelques flocons de pus 2 : muco-purulente 3 : purulente
Odeur décharge	Score olfactif de la décharge vaginale 0 : absence d'odeur

	1 : présence d'odeur fétide
PMN	Pourcentage de polynucléaires neutrophiles dans l'utérus
Éosinophiles	Pourcentage d'éosinophiles dans l'utérus
Basophiles	Pourcentage de basophiles dans l'utérus
Lymphocytes	Pourcentage de lymphocytes dans l'utérus
Macrophages	Pourcentage de macrophages dans l'utérus
Épithéliales	Pourcentage cellules épithéliales dans l'utérus
Endométrite subclinique	0 : vache indemne d'endométrite subclinique 1 : vache atteinte d'endométrite subclinique
Infiltration leucocytaire	0 : absence d'infiltration leucocytaire de l'endomètre 1 : légère infiltration leucocytaire 2 : infiltration leucocytaire moyennement sévère 3 : infiltration leucocytaire sévère
Épithélium	0 : absence d'épithélium endométriale sur les coupes histologiques 1 : présence d'épithélium endométriale sur les coupes histologiques
Congestion	0 : absence de congestion sur les coupes histologiques 1 : présence de congestion sur les coupes histologiques
Hémorragie	0 : absence d'hémorragie sur les coupes histologiques 1 : présence d'hémorragie sur les coupes histologiques
Œdème	0 : absence d'œdème sur les coupes histologiques 1 : présence d'œdème sur les coupes histologiques
Nid d'abeille	0 : absence de lésion en nid d'abeille sur les coupes histologiques 1 : présence de lésion en nid d'abeille sur les coupes histologiques
N° glandes	0 : absence totale des glandes sur les coupes histologiques 1 : glandes sont rares sur les coupes histologiques 2 : présence modérée des glandes sur les coupes histologiques 3 : glandes très abondantes sur les coupes histologiques
Dilatation glandulaire	0 : absence de dilatation kystique des glandes sur les coupes histologiques 1 : présence de dilatation kystique des glandes sur les coupes histologiques
Lacunes lymphatiques	0 : absence de lacunes lymphatiques 1 : présence de lacunes lymphatiques
Fibrose péri-glandulaire	0 : absence de fibrose péri-glandulaire 1 : légère fibrose péri-glandulaire 2 : présence moyennement intense de fibrose péri-glandulaire 3 : fibrose péri-glandulaire intense
V-1IA	Intervalle vêlage – première insémination artificielle (jours)
V-IF	Intervalle vêlage – insémination fécondante (jours)
N°IA	Nombre d'insémination pour avoir une gestation
RIA	Taux de réussite à la première insémination (%)
Gestation	0 : vache non gestante à 150 jours PP 1 : vache gestante à 150 jours PP

2.4. Analyse statistique

Les associations entre les variables qualitatives ont été analysées deux à deux à l'aide du test *khi-deux*. Les associations entre une variable qualitative et une variable quantitative ont été analysées à l'aide du test de *t Student*. Les associations entre les variables quantitatives ont été analysées à l'aide du test de corrélation de *Pearson* (régression logistique). Pour la détermination des facteurs de risque, nous avons utilisé la régression logistique mais tout d'abord et comme une élimination préparatoire, un test de *khi deux* est utilisé pour comparer les variations de chaque facteur de risque par chaque groupe d'endométrite. Ne sont inclus dans la régression logistique que les facteurs avec un taux de signification $P < 0.05$ pour chaque forme d'endométrite. Un test de Receiver Operating Characteristic (ROC) est utilisé pour calculer le seuil de neutrophile, spécifique à notre étude, pour interpréter la cytologie utérine [40].

3. Résultats

3.1. Description de l'échantillon

Au total 99 vaches laitières de races Prime'Holstein (n=73) et Montbéliard (n=26) ont été incluses dans la présente étude. Le diagnostic d'endométrite a été réalisé entre 21-60 JPP. La majorité des vaches de l'échantillon sont multipares ; 28% en 2^{ème} lactation, 32% en 3^{ème} lactation et 16% en 4^{ème} lactation contre 23% en 1^{ère} lactation. Le niveau de la production laitière varie entre 10 et 25 litres avec une moyenne de 18,4 litres durant les deux premiers mois après le part.

3.1.1. Durée de gestation

La moyenne de la durée de gestation dans l'échantillon de l'étude était 271 ± 5.7 jours (moyenne \pm écart type).

3.1.2. Induction de vêlage

Puisque la durée de gestation dans les élevages concernés par la présente étude n'était pas trop longue (moyenne= 271 jours), l'induction de vêlage était rarement appliquée (n=7).

3.1.3. Saison du vêlage

La répartition des vaches en fonction de la saison du vêlage est représentée sur le tableau suivant :

Tableau 16 : Répartition des vaches en fonction de la saison du vêlage

Saison	Effectif	Pourcentage (%)
Printemps	28	28.3
Automne	19	19.2
Hiver	36	36.4
Eté	16	16.2

3.1.4. Dystocies

En considérant l'assistance de vêlage et la césarienne comme des interventions dystociques distinctes, la répartition des vaches est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 17 : répartition des vaches en fonction de la nature de vêlage

Variable	Simple assistance de vêlage	Césarienne	Total de dystocie
Effectif	35	10	45
Pourcentage (%)	35.3	10.1	45.4

3.1.5. Rétention placentaire

Nous avons trouvé que 46% des vaches (n= 46) avaient une rétention placentaire dans les 24 heures suivant le part.

3.1.6. Maladies métaboliques

La fréquence de l'hypocalcémie, cétose et déplacement de la caillette entre le vêlage et le jour de diagnostic des endométrites sont résumés sur le tableau suivant (Cf. Tableau 18). Deux tiers (60.6%) des vaches ont présenté au moins un problème métabolique entre le vêlage et le jour de diagnostic d'endométrite, alors que l'hypocalcémie représentait la maladie métabolique la plus fréquente durant cette période avec une fréquence de 49.5%.

Tableau 18: Distribution des fréquences des maladies métaboliques chez les vaches de l'étude

Variable	Effectif	Pourcentage (%)
Déplacement de la caillette	15	15.1
Hypocalcémie	49	49.5
Cétose	25	25.2

3.1.7. nombre et sexe des veaux

Nous avons trouvé que 21% des vaches ont donné des jumeaux du même sexe alors que 4% ont donné des faux jumeaux (fœtus male et autre femelle). Le sexe des veaux était presque en proportion égale entre mâle et femelle 46,5 et 49,5%, respectivement. Le taux de mortinatalité enregistré dans la présente étude était 28%. (Cf. Tableau 19).

Tableau 19: Répartition des produits de vêlage selon le nombre, sexe et viabilité.

	Sexe de veaux			Nombre de veaux		Mortinatalité
	Male	Femelle	Faux jumeaux	1	2	
Effectif	49	46	4	78	21	28
Pourcentage (%)	49,5%	46,5%	4,0%	78,8%	21,2%	28,3%

3.1.8. Maladies infectieuses du postpartum

Nous avons constaté que 34% et 33% des vaches ont présenté des signes de métrite et de mammite, respectivement durant la période de l'étude. Parmi ces vaches, 17% ont présenté les signes des deux maladies durant cette période (Cf. Tableau 20).

Tableau 20 : Taux des pathologies de la reproduction entre le vêlage et le jour de diagnostic des endométrites

Variable	Effectif	Pourcentage (%)
Métrite	34	34.3
Mammite	33	33.3

3.1.9. BCS

L'évaluation de l'état d'engraissement des vaches durant la période d'étude, en adoptant, une échelle entre 0 et 5 nous avons trouvé que 75% des vaches avaient un BCS entre 2,5 et 3. Les autres vaches sont réparties entre scores 2 et 4 selon le tableau 21.

Tableau 21 : Représentation des vaches en fonction du BCS le jour de l'examen gynécologique.

Score BCS	Effectif	Pourcentage (%)
2	8	8.1
2.5	33	33.3
3	41	41.4
3.5	16	16.2
4	1	1

3.1.10. État de propreté de la région pelvienne

La majorité des vaches avaient un état de propreté considéré mauvais, dont 73% avec un score inférieur à 5 (Cf. Tableau 22).

Tableau 22: répartition des vaches en fonction du score total de propreté

Score total de propreté	Effectif	Pourcentage	Pourcentage cumulatif
0.0	3	3.0	3.0
0.5	3	3.0	6.1
1.0	11	11.1	17.2
1.5	13	13.1	30.3
2.0	9	9.1	39.4
2.5	9	9.1	48.5
3.0	8	8.1	56.6
3.5	9	9.1	65.7
4.0	2	2.0	67.7
4.5	5	5.1	72.7
5.0	4	4.0	76.8
5.5	3	3.0	79.8
6.0	6	6.1	85.9
6.5	4	4.0	89.9
7.0	2	2.0	91.9
7.5	5	5.1	97.0
8.0	3	3.0	100.0

3.1.11. Angle de la vulve

Nous avons constaté que 30.3% (n= 30) des vaches avaient un angle de vulve inférieur à 70° avec le plan horizontal. Ce critère est considéré comme un facteur de risque pour l'endométrite du fait qu'il est souvent associé à un vêlage dystocique [20]. En plus, la position horizontale de la vulve favorise sa contamination par les matières fécales.

3.2. Établissement d'un seuil de cytologie utérine positive

A l'aide du test statistique Receiver Operating Characteristic (ROC), nous avons trouvé que le seuil de neutrophiles spécifique à nos échantillons était 9% PMN. Ce seuil de neutrophiles représente le point de la courbe de ROC où le rapport sensibilité-spécificité de la cytologie utérine est à son maximum. De ce fait, chaque vache avec une cytologie utérine $\geq 9\%$ PMN a été considérée comme atteinte d'endométrite.

3.3. Facteurs de risque d'endométrite cytologique

Un test de *khi deux* est utilisé pour comparer les variations de chaque facteur de risque (entre eux) avec la forme d'endométrite (clinique et subclinique). Sont inclus dans la régression logistique, les facteurs avec un taux de signification $P < 0.05$ pour chaque forme d'endométrite.

Nous avons utilisé la régression logistique pour vérifier la corrélation de différents facteurs avec la présence ou l'absence d'une infection endométriale. La cytologie utérine avec un seuil de 9% PMN est utilisée comme méthode de référence pour différencier les vaches atteintes et indemnes d'endométrite. Les facteurs retenus inclus dans l'analyse par régression logistique sont mentionnés sur le tableau 23. La régression logistique a permis d'identifier les facteurs de risque suivants : rétention placentaire, mammite, sexe du veau, hypocalcémie et race (Cf. Tableau 24).

Tableau 23 : Facteurs de risque de l'endométrite cytologique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Facteurs
Race
Rétention placentaire
Assistance de vêlage
Césarienne
Mortinatalité
Déplacement de la caillette
Hypocalcémie
Cétose
Mérite
Mammite
Angle de vulve

Tableau 24 : Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endométrite cytologique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Variable	Coefficient	Odds ratio	IC 95%		P
			Inférieur	Supérieur	
Rétention placentaire	2.1	8.3	2.5	27.8	0.001
Mammite	1.7	5.8	1.6	20.9	<0.01
Sexe du veau	1.5	4.4	1.4	13.4	0.01
Hypocalcémie	1.3	3.8	1.2	12.1	<0.05
Race	-2.4	0.1	0	0.4	0.001

3.4. Facteurs de risque d'endométrite clinique

Pour différencier les vaches atteintes d'endométrite clinique (EC) avec ou sans cytologie utérine positive, nous avons considéré deux types de taux d'EC : taux apparent et taux réel. Le taux apparente concerne les vaches qui avaient une décharge vaginale positive sans prendre en considération les résultats de la cytologie utérine ; alors que le taux réelle concerne uniquement les vaches avec une décharge vaginale positive associée à une cytologie utérine positive

Les variables retenues pour l'analyse par la régression logistique sont mentionnées sur le tableau 25. En utilisant les résultats de l'endométrite clinique réelle comme une variable dépendante dans la régression logistique, nous avons trouvé que la rétention placentaire, la

mérite et la mortinatalité représentent les facteurs de risque pour l'endométrite clinique (Cf. Tableau 26).

Tableau 25: Facteurs de risque de l'endométrite clinique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Facteurs
Rétention placentaire
Nombre de veaux
Mortinatalité
Cétose
Mérite
Mammite
Angle de vulve

Tableau 26: Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endométrite clinique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Variable	Coefficient	Odds-ratio	IC 95%		P
			Inferieur	Supérieur	
Rétention placentaire	1.9	6.5	1.8	24.1	<0.01
Mérite	1.5	4.7	1.4	15.7	0.01
Mortinatalité	1.5	4.6	1.3	15.6	<0.05

3.5. Facteurs de risque d'endométrite subclinique

Du fait que l'endométrite cytologique englobe les deux formes cliniques (EC) et subcliniques (ESC), il était indispensable de déterminer les facteurs de risques qui concernent les vaches avec cytologie utérine positive, mais sans sécrétion purulente dans le vagin. Les variables retenues pour l'analyse par régression logistique sont mentionnées sur le tableau 27. L'analyse a permis de trouver que l'hypocalcémie, l'assistance de vêlage, ainsi que le sexe du veau représentent des facteurs de risque pour l'endométrite subclinique (CF. Tableau 28).

Tableau 27 : Facteurs de risque de l'endométrite subclinique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Facteurs
Césarienne
Assistance de vêlage
Sexe du veau
Hypocalcémie
Mammite

Tableau 28 : Odds ratio des facteurs de risque significatifs de l'endométrite subclinique chez les vaches examinées entre 21-60 JPP.

Variable	Coefficient	Odds-ratio	IC 95%		P
			Inferieur	Supérieur	
Hypocalcémie	2.0	7.7	1.9	31.2	<0.01
Assistance de vêlage	1.5	4.6	1.4	15.6	0.01
Sexe du veau	1.1	2.9	1.0	8.2	<0.05

4. Discussion

4.1. Facteurs de risque de l'endométrite cytologique

L'endométrite cytologique représente la forme d'endométrite associée à une cytologie utérine supérieure au seuil de référence, sans prendre en considération la présence ou l'absence de signe clinique [28]. De ce fait, l'endométrite subclinique englobe les deux formes clinique et subclinique sans distinction. Ces formes d'endométrites sont plus détaillées dans le chapitre expérimental 2.

Dans la présente étude expérimentale, nous avons trouvé que la rétention placentaire, la mammite, le sexe du veau, l'hypocalcémie et la race représentent les facteurs de risque de l'endométrite cytologique diagnostiquée entre 21-60 JPP par cytologie utérine, en adoptant un seuil de 9% PMN, sans prendre en considération les résultats de l'examen clinique. Parmi ces facteurs de risque, la rétention placentaire représente le facteur le plus important qui influence le taux des ESC avec un OR : 8.3 (95% IC : 2.5-27.8 ; P = 0.001).

Puisque nous n'avons pas trouvé beaucoup d'études qui traitent les facteurs de risque de l'endométrite cytologique, diagnostiquée uniquement par la cytologie utérine sans prendre en considération les résultats de l'examen clinique, nous n'avons pas pu comparer nos résultats avec

la littérature. La seule étude que nous avons trouvée est celle de Dubuc et al. [129] dont les seuls facteurs de risque de l'endométrite cytologique constatés par ces auteurs étaient un faible score corporel (BCS < 2.75) au moment du vêlage, acétonémie ($\geq 1,100 \mu\text{mol/L}$) et augmentation de taux d'haptoglobine dans le sérum ($\geq 0.8 \text{ g/L}$) durant la semaine suivant le part.

Puisque la mammite représente un réservoir bactérien et source de contamination pour l'utérus [15, 138], nous avons trouvé que l'infection de la vache par mammite durant les 60 jours suivant le part augmente significativement le risque de développement d'une EC entre 21-60 JPP avec OR : 5.8 (95% IC : 1.6-20.9, $P < 0.01$).

Bacha et Regassa [24] ont trouvé que ESC était directement en association avec la mammite subclinique à la 4^{ème} et 8^{ème} semaine postpartum avec OR : 4.5 et 3.6, respectivement ($P < 0.05$). Les auteurs expliquent que la relation entre l'endométrite et la mammite pourrait être due au passage des bactéries et/ou leurs toxines, en particulier les LPS de la glande mammaire vers la lumière utérine ou vice versa.

Le sexe mâle du veau a significativement augmenté le risque de l'endométrite cytologique dans la présente étude expérimentale avec OR : 4.4 (95% IC : 1.4-13.4, $P = 0.01$). Suite à une étude réalisée sur 57 301 vaches laitières, Ghavi Hossein-Zadeh et Ardalan [23] ont trouvé que le sexe mâle du veau est considéré comme un facteur de risque pour métrite avec OR : 2.4 (95%IC : 2.1–2.7, $P < 0.001$). Il semble que le sexe mâle augmente le risque de dystocie et l'endométrite clinique [104]. Cela est surtout due à la taille plus importante du veau male par rapport au veau femelle, de ce fait, sa naissance est souvent associée à un vêlage dystocique. Dans le même sens, Potter et al. [20] ont trouvé que le sexe mâle du veau augmente le risque d'endométrite clinique par risque relatif (RR) de 1.5, et la prévalence de l'endométrite pourrait être réduite de 60% si tous les veaux nés étaient de sexe femelle

Nous avons trouvé que l'hypocalcémie diagnostiquée durant les deux premiers mois après vêlage augmente le risque de l'endométrite cytologique aux 21-60 JPP avec OR : 3.8 (95% IC : 1.2-12.1, $P < 0.05$). Notre résultat est très proche de l'OR de 3.5 (95% IC : 1.1-10.8, $P = 0.03$) enregistré par Kim et Kang [19] pour l'influence de l'ensemble des problèmes métaboliques y a compris

l'hypocalcémie sur l'incidence des endométrites diagnostiquées uniquement par un examen clinique, sans faire un diagnostic cytologique. L'hypocalcémie peut favoriser l'apparition de dystocie suite à une faible motilité de l'utérus ce qui augmente le risque de rétention placentaire et les infections utérines avec OR : 3.7 [23, 135]. Indirectement, il semble que l'hypocalcémie subclinique influence la prévalence des endométrites en augmentant le risque d'autres maladies telles que la RP, l'acétonémie et le déplacement de la caillette suivant la diminution de la motilité du rumen [21, 135].

La présente étude a permis de mettre en évidence que la race Prim'Holstein diminue significativement le risque de développer une endométrite cytologique avec OR : 0.1 (95% IC : 0-0.4, $P = 0.001$). Cela veut dire que l'endométrite cytologique entre 21-60 JPP est beaucoup moins fréquente chez la race Prim'Holstein que chez la race Montbéliarde. Autrement dit, la race Prim'Holstein a un effet protecteur contre l'endométrite cytologique en comparaison avec la race Montbéliarde. Suite à une étude réalisée sur 121 vaches repeat-breeder indemnes d'EC, Pothmann et al. [94] ont trouvé que la race de la vache n'affecte pas significativement la prévalence des endométrites subcliniques (OR : 1.4, $P = 0.55$). De même, McDougall et al. [54] ont trouvé que la race n'est pas considérée comme un facteur de risque pour l'endométrite clinique. Notre constatation pourrait être expliquée par le fait que la conformation anatomique de la race Montbéliarde avec un bassin étroit favorise le vêlage dystocique, ce qui nécessite une assistance de vêlage ou même une césarienne ce qui aggrave la contamination bactérienne de l'utérus et favorisent les endométrites.

4.2. Facteurs de risque de l'endométrite clinique

Dans la présente étude la rétention placentaire représente le facteur de risque le plus important pour l'EC avec un OR : 6.5 (95% IC : 1.8-24.1 ; $P < 0.01$) qui est très proche (OR : 6 (95% IC : 2.8-7.5)) de celui rapporté par Correa et al. [118].

Depuis longtemps, le risque de la RP sur les infections utérines notamment EC a été confirmé [19, 20, 257]. Des résultats similaires ont été aussi mentionnés par Kim et Kang [19] avec un OR de 5.7 (95% IC : 3.1, 10.4, $P < 0.0001$).

De même Wagener et al. [32] ainsi que Potter et al. [20] ont trouvé que la rétention placentaire représente un facteur de risque très important pour EC avec respectivement un OR : 12.4 (95% IC = 1.4–112.7, $P = 0.03$) et 43.5, (95% IC : 5.3-355.8, $P = 0.001$), valeurs supérieures à celle trouvée dans notre étude.

La RP maintient le col de l'utérus largement entrouvert ce qui favorise l'entrée des bactéries et la contamination de l'utérus. De plus, la présence du tissu nécrotique dans la lumière de l'utérus rencontrée dans le cas de RP représente un milieu favorable pour la multiplication bactérienne. L'ensemble de ces événements retarde l'involution de l'utérus et la régénération du tissu endométrial tout en favorisant la persistance de l'infection [12, 20]. Bien que certains auteurs pensent que la rétention placentaire est parfois d'origine génétique [258], la plupart d'entre eux affirment qu'elle est causée par une altération de la fonction des neutrophiles à l'origine d'un échec d'élimination du placenta après le part [259]. Hammon et al [140] et Deguillaume [42] ont constaté aussi que l'endométrite est associée à un dysfonctionnement de l'activité phagocytaire des neutrophiles à l'origine de la persistance de l'infection endométriale. Zadeh et Ardalan [23] confirme cette relation de causalité dans le cas de métrite et EC avec un OR : 27.7. Salasel et al. [8] ont trouvé que les vaches avec rétention placentaire présentaient plus fréquemment des infections utérines (métrite, pyomètre ou endométrite) que les vaches sans rétention placentaire (71% contre 27%, respectivement).

Les autres facteurs qui ont été identifiés dans la présente étude comme facteurs de risque pour l'EC suite à l'analyse multivariable étaient la métrite et la mortinatalité. Nos résultats ont montré que ce dernier facteur influence la fréquence des EC avec OR : 4.6 (95% IC : 1.3-15.6, $P < 0.05$). Cela est proche à OR de : 7.5 (95% IC : 3.0-18.5, $P = 0.001$) trouvé par Potter et al. [20] suite à une étude réalisée sur 293 vaches atteintes d'EC.

Correa et al. [118] ont trouvé que la mortinatalité influence de façon significative le risque de développer une EC et la métrite avec un OR : 1.5 (95% IC : 1.1-2.1), qui est inférieur à celui enregistré dans notre étude. Il semble que la mortinatalité favorise l'EC par le traumatisme endométrial associé à sa délivrance et qui nécessite généralement une assistance de vêlage,

aggravant le traumatisme et favorisant ainsi l'entrée des bactéries à dans l'utérus [20, 23, 129, 260].

Prunner et al. [33] et Giuliadori et al. [116] ont rapporté que les vaches qui étaient sujettes à un vêlage dystocique, avec assistance, avaient plus de chances de développer une EC avec OR de 1.8 et OR ajustés de 2.2, respectivement. Dubuc et al. [129] ont confirmé la relation de causalité entre la dystocie et EC avec OR : 2.13 (95% IC : 1.43–3.9, $P < 0.01$).

Il semble qu'il y a une forte corrélation entre les facteurs de risque que nous avons trouvés en association avec EC, à savoir la RP, la métrite et la mortinatalité. Ainsi que la dystocie qui en résulte favorise la contamination bactérienne de l'utérus, et génère un traumatisme pour la femelle ce qui augmentent le risque de développement d'une RP et la métrite [260]. De plus, l'activité antimicrobienne des neutrophiles est altérée dans le cas d'un vêlage dystocique, ce qui augmente le taux d'infection utérine suite à une immunodépression [144]. En revanche, il est important de comprendre que toutes les vaches avec RP ne vont pas systématiquement développer une métrite, de même, les vaches avec une métrite ne vont pas toutes développée une endométrite clinique [129]. Ces auteurs pensent que même si ces trois pathologies sont liées, la présence de l'une de ces maladies n'est pas indispensable pour le développement de l'autre.

Dans notre étude, nous avons constaté que la métrite représente un facteur de risque important pour l'EC avec un OR : 4.7 (95%IC : 1.4-15.7, $P=0.01$). Giuliadori et al. [116] ont trouvé que la métrite notamment la forme puerpérale affecte de façon dramatique la prévalence d'endométrite clinique avec un Odds-ratio ajusté de 2.2.

Wagener et al. [32], en essayant d'étudier la dynamique des infections utérines, ont trouvé que l'infection par un pathogène major tel que *Trueperella pyogenes* au 21^{ème} JPP augmente significativement et de façon dramatique le risque de EC avec OR = 36 (95% CI = 3.8–343.2, $P < 0.01$). De ce fait, la présence d'une infection au début de la période postpartum, notamment au niveau de l'utérus pourrait favoriser la persistance et la prolongation d'une infection et inflammation endométriale, cervicale ou même vaginale [129]

Nous avons trouvé que la cétose n'était pas significativement associée à l'EC ($P > 0.05$) contrairement aux résultats de Kim et Kang [19], qui ont trouvé que les problèmes métaboliques (déplacement de la caillette, hypocalcémie et la cétose, tous confondus) affectent significativement la prévalence des EC chez la vache laitière ($P < 0.03$). Néanmoins, Kim et Kang [19] ont considéré les trois problèmes métaboliques comme un seul facteur de risque, ce qui met en doute la relation directe de la cétose sur l'endométrite clinique dans leur études.

4.3. Facteurs de risque de l'endométrite subclinique

L'ESC est influencée par trois facteurs à savoir l'hypocalcémie, l'assistance de vêlage et le sexe mâle du veau. Parmi ces facteurs de risque, l'hypocalcémie augmente le risque de ESC avec un OR de : 7.7 (95% IC : 1.9-31.2, $P < 0.01$). En revanche, Cheong et al. [17] en essayant de déterminer les facteurs de risque qui favorisent l'installation des ESC à l'échelle de la vache ont trouvé que l'hypocalcémie n'affecte pas la prévalence des ESC.

L'hypocalcémie pourrait affecter un ou plusieurs événements clés de la période postpartum nécessaires pour une fertilité optimale, à savoir la reprise de l'activité ovarienne, l'involution utérine et l'élimination de la contamination microbienne de l'utérus [261]. L'involution utérine et l'élimination des lochies puerpérales dépendent des contractions rythmiques de l'utérus, qui sont supprimés par l'hypocalcémie. Autrement dit, la contamination de la lumière utérine après le part est quasiment inévitable chez la vache laitière, heureusement qu'elle est progressivement résolue par l'involution utérine rapide, élimination de lochies et la mobilisation des défenses immunitaires [262]. De ce fait, une hypocalcémie va inévitablement retarder la décontamination utérine. L'accumulation des sécrétions utérines et l'absence de leurs éliminations, suite à la carence du calcium, représentent un milieu favorable pour la multiplication bactérienne et une barrière efficace contre beaucoup d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections utérines [178].

Dans la présente étude, nous avons trouvé que l'assistance de vêlage influence la prévalence de l'ESC avec un OR de : 4.6 (95% IC : 1.4-15.6, $P = 0.01$). Dans le même sens, nous

avons constaté que le sexe mâle du veau augmente le risque d'ESC avec OR : 2.9 (95% IC : 1.0-8.2, $P < 0.05$).

Selon Potter et al. [20], le sexe mâle du veau est souvent associé à un vêlage dystocique a l'origine de traumatisme de l'utérus. Salasel et al. [8] ont démontré que les vaches avec un vêlage dystocique avaient plus de chances de développer une ESC aux 190 ± 40 JPP avec OR : 7.27 (95% IC : 1.9-27.4 ; $P = 0.003$). En revanche, Pothmann et al. [94] ont trouvé, suite à une étude réalisée sur 121 vaches laitière que la race, le nombre de parité, l'assistance de vêlage et la métrite n'étaient pas significativement en relation avec L'ESC ($P > 0.05$).

Quelques facteurs de risque sont différents pour les trois formes d'endométrite. Dubuc et al. [129] ont confirmé que les facteurs de risque de l'EC sont parfois différents à ceux de l'endométrite cytologique. Ces auteurs ont déclaré que les facteurs de risque de EC comprennent les facteurs qui favorisent le traumatisme de l'utérus et augmentent sa contamination bactérienne, comme la dystocie et la métrite. En revanche, les facteurs de risque de l'endométrite cytologique reflètent une défaillance du système immunitaire ou un problème métabolique durant la période péripartum [129] .

5. Conclusion

Il est très important de différencier entre l'endométrite cytologique, clinique et subclinique du fait que chaque forme est influencée par des facteurs de risque spécifiques. Les pathologies rencontrées durant les deux premiers mois après vêlage influencent significativement la prévalence des endométrites. L'hypocalcémie et le sexe du veau augmentent le risque de l'endométrite cytologique et ESC, alors que la rétention placentaire est considérée comme un facteur de risque commun pour l'endométrite cytologique et EC. La métrite est un facteur de risque spécifique à EC. L'assistance de vêlage affecte spécifiquement la prévalence de ESC, alors que la mammite et la race de la vache sont des facteurs de risque spécifiques pour l'endométrite cytologique.

CHAPITRE 3 : IMPACTES DES ENDOMETRITES

1. Introduction

Le postpartum est une période critique dans la vie des bovins laitiers et nécessite une gestion rigoureuse surtout pour les infections utérines qui sont très fréquents après le vêlage et diminuent progressivement avec les jours du postpartum [7, 130]. La santé économique d'un troupeau dépend notamment de la fréquence des infections du tractus génital. L'importance des infections utérines est surtout en relation avec les pertes économiques dues à la dégradation des performances de la reproduction [3, 41]. Bien que l'élevage laitier en Algérie soit depuis longtemps en extension, les problèmes de fertilité et de fécondité représentent toujours des problèmes qui retardent le développement de ce domaine et alourdissent la facture de la production.

L'objectif de la présente partie expérimentale est de mettre en cause la relation entre la prévalence des endométrites et la détérioration des paramètres de fécondité et de fertilité dans les élevages laitiers en Algérie.

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillon de l'étude

Cette étude expérimentale a été sur les mêmes vaches que celles étudiées, dans les deux premiers chapitres. Les 99 vaches laitières de race Prim-Holstein (n=73) et Montbéliarde (n= 26) se trouvant entre 21-60 jours après vêlage ont été examinées en vue d'un diagnostic des endométrites et d'un suivi des paramètres de reproductions. Pour ce faire, nous avons reparti les vaches en quatre groupes selon le statut inflammatoire de leurs uteri : endométrite cytologique, subclinique, clinique ou indemnes. Pour chaque groupe, les paramètres de reproductions suivants ont été enregistrés : intervalle vêlage-première insémination (V-1IA), vêlage-insémination fécondante (V-IF), nombre d'insémination pour avoir une gestation (N°IA) et le taux de réussite à la première insémination (RIA).

2.2. Diagnostic des endométrites cytologiques

Il a été réalisé en utilisant la cytologie utérine à l'aide d'une cytobrosse considérée comme une technique de référence. La technique de prélèvement est celle expliquée dans le chapitre 1. Le seuil d'interprétation était fixé à 9% de PNN selon les résultats du chapitre 1.

2.3. Diagnostic des endométrites cliniques

Il a été réalisé en examinant le contenu vaginal à l'aide d'une main gantée selon la technique détaillée dans le chapitre 1. Selon l'interprétation de Williams et al. [53] et Madoz et al. [15], chaque vache avec une cytologie utérine > 9% PNN associée à une décharge vaginale de score 1 à 3 et ou d'odeur fétide, est considérée comme atteinte d'endométrite clinique.

2.4. Diagnostic des endométrites subclinique

Les vaches qui avaient une décharge vaginale négative mais une cytologie utérine positive ont été classées comme atteintes d'endométrites subcliniques. Toute vache avec une cytologie utérine négative est considérée indemne d'endométrite quel que soit le résultat de l'examen du contenu vaginal.

2.5. Diagnostic de gestation

Il a été réalisé par exploration rectale, et parfois par échographie transrectale. Le diagnostic de gestation est réalisé systématiquement à 150 jours après le part.

2.6. Analyse statistique

La vache est considérée comme unité expérimentale. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide de logiciel SPSS version 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Les associations entre les variables qualitatives ont été analysées deux à deux à l'aide du test du *Khi-deux*. Les associations entre une variable qualitative et une variable quantitative ont été analysées à l'aide du test *t* de Student.

3. Résultats

3.1. Descriptif des paramètres de reproduction

3.1.1. Caractéristiques des paramètres de reproduction chez les vaches indemnes d'endométries

La cytologie utérine a été utilisée comme une méthode de référence pour le diagnostic des endométries. De ce fait, les vaches indemnes d'endométries sont celles qui sont avec une cytologie utérine négative (<9% PMN) quel que soit le résultat de leur décharge vaginale. Cinquante-huit vaches (58.6%) avaient une cytologie utérine négative entre 21-60 JPP. Les paramètres de reproduction qui caractérisent le groupe des vaches indemnes d'endométrie sont mentionnés dans le tableau 29.

L'intervalle vêlage -1^{ère} insémination chez les vaches indemnes d'endométrie était très proche à l'intervalle V-IF (71.4 contre 71.7 jours), indiquant que la majorité des vaches appartenant à ce groupe (n= 46/58) ont nécessité une seule insémination pour avoir une fécondation. Le diagnostic de gestation réalisé à 150 JPP a permis de mettre en évidence que la quasi-totalité (n = 52) des vaches non affectées étaient gestante.

3.1.2. Caractéristiques des paramètres de reproduction chez les vaches atteintes d'endométries cytologiques

Ce groupe englobe toutes les vaches atteintes d'endométrie (avec un examen cytologique positif) sans prendre en considération la forme clinique de l'endométrie (clinique ou subclinique). Cette forme d'endométrie est de plus en plus importante du fait que l'examen macroscopique de la décharge vaginale n'est pas toujours indicatif de l'état inflammatoire de

l'utérus [28]. De ce fait, la cytologie utérine est souvent la seule méthode de diagnostic des endométrites et forme clinique trouvée est qualifiée comme endométrite cytologique [171, 250].

La moyenne de l'intervalle vêlage-première insémination était 92.6 jours, alors que l'intervalle vêlage-insémination fécondante était 113.8 jours. La différence entre les deux paramètres était de 21 jours, une période équivalente à un cycle de retard de fécondation, indiquant ainsi que la vache atteinte d'endométrite cytologique entre 21-60 JPP nécessite au moins deux inséminations pour avoir une gestation. La moyenne de nombre de services pour avoir une conception était de 2.4 avec un maximum de 4 inséminations chez certaines vaches (2/41). Le taux de gestation chez ce groupe de vaches était relativement faible 39% (16/41) par rapport au groupe des vaches indemnes d'endométrites (89.6%).

3.1.3. Caractéristiques des paramètres de reproduction chez les vaches atteintes d'endométrite clinique

Ce groupe englobe les vaches atteintes d'endométrite cytologique qui avaient une décharge vaginale positive. L'interprétation de l'aspect et l'odeur de la décharge vaginale ont été faites selon un protocole modifié [15, 53]. Les vaches atteintes d'endométrite clinique réelle (n=22) présentaient les paramètres de reproduction mentionnés sur le tableau 29. Six vaches ont été détectées avec une décharge vaginale positive associée à une cytologie utérine négative. Ces vaches ont été qualifiées comme atteintes de vaginite et indemnes d'endométrite et ont été exclues du groupe de vaches atteintes d'endométrite clinique.

Les vaches atteintes d'endométrite clinique ont nécessité généralement plusieurs inséminations pour avoir une gestation. La moyenne du nombre d'insémination pour avoir une fécondation est de 2.4. Environ, la moitié (45.4%) des vaches avec une endométrite clinique réelle ont été diagnostiquées gestante à 150JPP.

Tableau 29 : Paramètres de fécondité et fertilité de différents groupes de vaches classées en fonction de l'état sanitaire de l'utérus.

Paramètres de reproduction	Vaches non infectées (n=58)	Vaches atteintes d'endométrite cytologique (n=41)	Vaches atteintes d'endométrite clinique (n=22)	Vaches atteintes d'endométrite subclinique (n=19)
Intervalle velage-1ère insémination (jours)	71,4 ^{ab}	92.6	90,1 ^a	95,6 ^a
Intervalle vêlage-insémination fécondante (jours)	71,7 ^{ab}	113.8	108,7 ^a	119,7 ^a
Intervalle vêlage-dernière insémination (jours)	76,5 ^{ab}	121.3	119,7 ^a	123,2 ^a
Réussite à la 1 ^{ère} insémination n (%)	46 (79,3%) ^{ab}	3 (7.3%)	3 (13,6%) ^a	0 (0%) ^b
Nombre d'insémination par conception				
1 insémination par vache (n° vaches)	46	4	3	1
2 insémination par vache (n° vaches)	10	20	8	12
3 insémination par vache (n° vaches)	2	15	10	5
4 insémination par vache (n° vaches)	0	2	1	1
Nombre moyenne d'insémination par vache	1,2 ^{ab}	2.4	2,4 ^a	2,3 ^a
Nombre de vaches gestantes (%)	52 (89,6%) ^{ab}	16 (39%)	10 (45,4%) ^a	6(31,6%) ^a

^{a, b} Paramètres avec différentes suscriptions au niveau de chaque ligne diffèrent significativement (P < 0.05).

3.1.4. Caractéristiques des paramètres de reproduction chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique

Ce groupe englobe les vaches atteintes d'endométrite cytologique qui avaient une décharge vaginale négative. Les paramètres de reproduction des vaches de ce groupe sont mentionnés sur le tableau 29.

Les vaches qui font partie de ce groupe présentaient un intervalle V-1IA plus long que l'intervalle V-IF par 24 jours, équivalant à une durée d'un cycle œstral, indiquant ainsi que les vaches avec endométrite subclinique se fécondaient, généralement, après la deuxième insémination avec une moyenne d'insémination de 2.3. Trois mois après (150 jours) six vaches ont été diagnostiqués gestantes.

4. Discussion

La bonne gestion des élevages laitiers nécessite une gestion rigoureuse des paramètres de la reproduction notamment la reprise de l'activité ovarienne à la fin de la période d'attente physiologique et l'involution utérine complète, avec élimination totale des batteries, ce qui facilite l'implantation de l'embryon sur l'endomètre [14, 248]. Il est certain que l'endométrite sous ses deux formes cliniques et subcliniques a des effets dramatiques sur les performances de la reproduction chez la vache [7, 14, 248, 263, 264].

La présente étude expérimentale représente une des rares enquêtes sur l'impact des endométrites sur les performances de la reproduction dans les élevages laitiers Algériens. Cette étude a démontré des effets négatifs des endométrites sur la vie reproductive de la vache comme il a été déjà constaté par plusieurs auteurs à travers le monde entier et sous différentes conditions d'élevage [16-18, 26].

4.1. Intervalle velage-1ère insémination (V-1IA)

Il n'était pas étonnant de trouver que l'intervalle V-1IA est plus court chez les vaches indemnes que les vaches atteintes d'endométrite clinique (71.4 contre 90.1 jours ; $P < 0.001$). Les vaches avec endométrites subcliniques présentaient un intervalle légèrement mais pas significativement plus long (95.6 jours) que celui des vaches atteintes d'endométrite clinique ($P > 0.05$). Bien que la différence ne soit pas significative, la vache atteinte d'endométrite

subclinique prend plus de temps pour reprendre son activité ovarienne que les vaches avec endométrite clinique.

Nous avons constaté que les vaches atteintes d'endométrite clinique sont inséminées 19 jours en retard que les vaches saines, alors que les vaches atteintes par la forme subclinique sont inséminées 24 jours en retard que les vaches saines. LeBlanc et al. [7] ont trouvé que l'endométrite clinique retarde la reprise de l'activité ovarienne après le part et augmente l'intervalle V-1IA de 5 jours par rapport aux vaches saines (80 contre 75 jours, respectivement ; $P < 0.001$). De même, Toni et al. [265] ont trouvé que l'endométrite clinique diagnostiquée entre 28-35 JPP augmente significativement et de façon dramatique l'intervalle V-1IA chez les primipares avec 75 jours et les multipares avec 60 jours par rapport aux vaches saines.

Plöntzke et al. [248] ont trouvé que la différence de l'intervalle V-1IA entre les vaches atteintes d'endométrite clinique et les vaches saines n'était pas significative (59 contre 58 jours, respectivement). Dans le même contexte, Barlund et al. [41] ont rapporté que les vaches atteintes d'endométrites subcliniques entre 28-41 JPP avaient un intervalle V-1IA de 77.7 jours contre 79.6 jours bien que la différence ne fût pas significative.

En essayant d'expliquer comment l'endométrite clinique affecte négativement les performances de la reproduction, Giuliadori et al. [116] à l'aide des constatations enregistrées par d'autres chercheurs, ont démontré que l'endométrite commence par retarder la reprise de l'activité ovarienne après le part [30, 61] ; deuxièmement par la production d'un petit corps jaune qui n'assure qu'une très faible concentration de progestérone circulatoire [160] ; troisièmement par un dérèglement de l'environnement utérin [130] et finalement par l'altération du développement embryonnaire [266].

De point de vue immunologique, il semble que la prostaglandine E2 très abondant durant une endométrite avec la faible production de PGF2alpha affecte le bon fonctionnement des ovaires notamment la croissance folliculaire [163]. Ce qui retarde la reprise de l'activité ovarienne et prolonge l'intervalle vêlage-1ere insémination et vêlage - vêlage. Au niveau folliculaire, la concentration des toxines bactériennes notamment LPS est très élevée dans le liquide folliculaire ce qui perturbe fortement l'activité d'aromatase et la synthèse d'œstrogène au niveau des cellules de granulosa [245]. Ce qui veut dire que même si la vache est inséminée suite à une expression des signes de chaleurs, l'insémination ne sera

pas fécondante par faute d'ovulation, ce qui augmente le nombre d'insémination pour avoir une gestation.

4.2. Intervalle vêlage-insémination fécondante (V-IF)

Les vaches souffrant d'une endométrite subclinique ont nécessité un peu plus de temps pour avoir une insémination fécondante que les vaches atteintes d'endométrite clinique (119.7 contre 108.7 jours, respectivement ; $P > 0.05$). Les vaches non affectées présentaient un intervalle V-IF plus court (71.7 jours) que celui des vaches affectées par l'une des deux formes d'endométrite ($P < 0.01$).

L'endométrite subclinique a augmenté le nombre de jours ouverts par 48 jours contre 37 jours pour l'endométrite clinique. Vieira-Neto et al. [267] ont enregistré une élongation de 43 jours dans l'intervalle V-IF pour les vaches cycliques et atteintes d'endométrite subclinique par rapport aux vaches cycliques et indemnes d'endométrite, ce qui est très proche aux 48 jours trouvés dans notre étude. LeBlanc et al. [7] et Fourichon et al. [9], ont trouvé que l'endométrite clinique allonge l'intervalle V-IF et augmente le nombre des jours ouverts par 28 et 19 jours, respectivement. Dans une étude récente, Toni et al. [265] confirment l'effet délétère des endométrites cliniques sur l'allongement de l'intervalle V-IF.

Pour l'endométrite cytologique, Barlund et al. [41] ont rapporté que cette forme qui englobe les deux formes cliniques et subcliniques augmentent l'intervalle V-IF par 24 jours ($P < 0.05$) contre 42 jours enregistré dans notre étude.

4.3. Taux de réussite à la première insémination

Puisque les vaches avec endométrite subclinique présentent un intervalle V-IF plus long que l'intervalle V-1IA, le taux de réussite à la première insémination est très faible par rapport aux vaches indemnes d'endométrite et même par rapport aux vaches atteintes d'endométrite clinique (0% contre 79.3% et 13.6%, respectivement ; $P < 0.05$).

Il semble que l'endométrite subclinique affecte dramatiquement les chances de fécondation après insémination, notamment pour la première insémination après vêlage. Le très faible taux de réussite à la 1IA (0%) enregistré dans la présente étude parmi le groupe des vaches avec endométrite subclinique est proche au 5% rapporté par Salasela et al. [8]. Ces auteurs ont enregistré aussi un taux de conception suite à la 1IA chez les vaches indemnes

d'endomérite de l'ordre de 47% ce qui est faible par rapport au 79.8% trouvé dans notre étude. Cette grande différence parmi les vaches saines pourrait être expliquée par le fait que ces auteurs [8] ont travaillé sur des vaches Repeat-Breeder qui sont connues par leur faible fertilité. Gilbert et al. [3] ont trouvé que le taux de réussite à la 1IA était de l'ordre de 11% dans le groupe des vaches atteintes d'endomérite subclinique alors que Vieira-Neto et al. [267] ont enregistré un taux de 21.3% chez les vaches atteintes d'endomérite subclinique mais non cycliques contre 36% pour les vaches cycliques et atteintes d'endomérite subclinique diagnostiquées entre 32-53 JPP. Dans cette dernière étude [267], la cyclicité des vaches a été déterminé le jour de diagnostic des endomérites soit entre 32-53 JPP

Nous avons constaté que l'endomérite clinique provoque une chute de taux de réussite à la 1IA par 65.7% ce qui est très grave par rapport au 20% rapporté par Fourichon et al. [9] et plus grave par rapport aux 6.2 et 8.1 enregistrés par Plöntzke et al. [248] et LeBlanc et al. [7], respectivement. En revanche, Plöntzke et al. [248] ont trouvé que le taux de réussite à la 1IA chez les vaches atteintes d'endomérite clinique était 25.7% contre 31.9% pour les vaches saines, mais la différence n'était pas significative ($P = 0.08$). Toni et al. [265] confirment dans une étude récente que l'endomérite clinique diagnostiquée entre 28-35 JPP diminue très fortement le risque de gestation après première insémination

Barlund et al. [41] ont trouvé que la probabilité de gestation suite à la 1IA était 14.2% et 32.1% chez les vaches atteintes d'endomérite cytologique et indemnes, respectivement. Du fait que l'endomérite cytologique regroupe les deux formes cliniques et subcliniques sans distinction, il est clair que le résultat de ces auteurs pour l'endomérite cytologique (14.2%) est très proche au 13.6% enregistré dans notre étude pour les vaches atteintes d'endomérite clinique.

Contrairement à la forme subclinique, il semble que la forme clinique de l'endomérite incite l'éleveur et même le vétérinaire à intervenir le plus tôt possible suite à la détection des symptômes, par un traitement intensif et une prise en charge qui améliore l'état général de l'animal, ce qui permet même d'éradiquer d'autres pathologies si l'antibiothérapie est utilisée par voie générale. En plus, d'après ce que nous avons constaté sur le terrain, les éleveurs améliorent souvent les conditions d'hygiène et l'alimentation des vaches atteintes d'endomérite clinique en vue d'avoir une guérison rapide. Toute cette prise en charge permet d'améliorer l'état général de la vache atteinte d'endomérite clinique et d'augmenter les

chances de fécondation après insémination, ce qui pourrait expliquer que le taux de réussite à la première insémination est plus élevé chez les vaches atteintes de l'endométrite clinique en comparaisant avec celles qui sont atteintes d'endométrite subclinique.

Dans le même contexte, pour confirmer la relation entre l'endométrite subclinique et l'échec de l'insémination, nous avons essayé d'inséminer un groupe de 6 vaches cliniquement saines, mais la cytologie utérine a démontré qu'il y avait une endométrite subclinique. Après 2 mois, le diagnostic de gestation sur toutes ces vaches était négatif. Bien que le nombre de vache soit très faible et n'est pas représentatif de la population étudiée, des études ultérieures dans le même domaine sur un effectif plus important pourrait donner des informations plus sûrs et plus significatives.

4.4. Nombre d'insémination réalisée sur chaque vache

Comme prévu, les vaches indemnes d'endométrite nécessitent un nombre d'insémination plus faible pour avoir une gestation par rapport aux vaches atteintes d'endométrite clinique ou même subclinique (1.2 contre 2.4 et 2.3 respectivement ; $P < 0.01$). La différence entre les vaches atteintes d'endométrite clinique et subclinique n'était pas significative ($P > 0.05$).

Pour les vaches indemnes, la majorité se trouve gestante après la première insémination (79.3%). Les vaches atteintes d'endométrite subclinique se trouvent généralement gestantes après la deuxième ou la troisième insémination. Plöntzke et al. [248] ont confirmé que les vaches atteintes d'endométrite clinique nécessitent un nombre d'insémination significativement plus important que les vaches indemnes (4.4 contre 3.1 ; $P < 0.05$).

Il clair, dans la présente étude que l'endométrite sous ses deux formes clinique et subclinique augmente le nombre d'insémination pour avoir une gestation et par conséquent le cout de la reproduction et de l'élevage seraient plus onéreux. Du fait que l'endométrite subclinique ne pourrait pas être détectée par l'éleveur et même par un examen clinique, les vaches atteintes subcliniquement sont souvent inséminées par erreur. Nous jugeons que l'endométrite subclinique est la cause principale de l'échec de l'insémination dans les élevages laitiers en Algérie.

Barlund et al. [41] ont rapporté que les vaches atteintes d'endométrite subclinique nécessitent d'être inséminées 2.9 fois pour avoir une gestation alors que les vaches saines

nécessitent 2.3 inséminations, mais la différence n'était pas significative ($P > 0.05$). Nos résultats en ce qui concerne le nombre d'insémination pour avoir une gestation sont faibles par rapport aux 3.7 et 3.4 enregistrés par Plöntzke et al. [57] pour les vaches avec endométrite subcliniques et saines, respectivement. Dans cette dernière étude Plöntzke et al. [57] ont travaillé sur des vaches en stabulation libre surtout en pâturage alors que notre étude a été réalisés sur des vaches en stabulation entravée, ce qui pourrait expliquer cette différence de résultat. De plus, la prévalence d'endométrite subclinique très élevée (38%) trouvée par Plöntzke et al. [57] par rapport à notre résultat (19.2%) pourrait expliquer la différence de nombre d'insémination pour avoir une gestation.

4.5. Taux de gestation

Le diagnostic de gestation après le 150^{ème} jour postpartum a permis de confirmer que l'état sanitaire de l'utérus affecte de façon dramatique le taux de gestation. Les vaches atteintes d'endométrite subclinique ont présenté un faible taux de gestation (31.6%). Bien que les vaches affectées par la forme clinique aient présenté un taux de gestation acceptable (45.4%), il était beaucoup plus faible par rapport aux vaches indemnes d'endométrite (89.6% ; $P < 0.05$). La différence de taux de gestation entre les vaches atteintes d'endométrite subclinique et clinique n'était pas statistiquement significative ($P > 0.05$). Démontrant ainsi que le taux de gestation est gravement affecté quelle que soit la forme d'endométrite.

Plöntzke et al. [248] ont trouvé que le taux de gestation était significativement faible chez les vaches atteintes d'endométrite clinique par rapport aux vaches indemnes. Ces auteurs ont trouvé que les vaches avec endométrite clinique étaient dans 65.5% gestantes ce qui est élevée par rapport au 54.5% enregistré dans notre étude.

Il semble, selon notre étude que le taux de gestation à 150 JPP diminue avec presque de moitié (44.2%) dans le cas d'endométrite clinique tandis que Fourichon et al. [9] ont rapporté une diminution à la même période de diagnostic de gestation à 150 JPP de 31%. Giuliadori et al. [116] et De la Sota et al. [264] ont trouvé que les vaches atteintes de la forme clinique d'endométrite avaient une plus faible chance de gestation diagnostiquée à 100 et 200 JPP. L'impact de l'endométrite clinique sur le taux de gestation trouvé dans notre étude a été déjà confirmé par plusieurs auteurs [7, 54, 116].

Pour l'endométrite subclinique, Gilbert et al. [3] ont trouvé que cette forme d'endométrite était associée à 63% de taux de gestation, ce qui est très élevé par rapport au 31.6% enregistré dans notre étude. Cette grande différence pourrait être expliquée par le fait que, dans la présente étude le diagnostic de gestation a été réalisé à 150 JPP alors que Gilbert et al. [3] ont fait le diagnostic à 300 JPP ce qui augmente la chance de gestation en allongeant l'intervalle entre le jour d'insémination et le jour de diagnostic de gestation.

En d'autre partie, chez les vaches indemnes le taux de gestation enregistré dans notre étude (89.6%) était très proches au 86% rapporté par Gilbert et al. [3] aux 300 JPP. De ce fait, le diagnostic de gestation pourrait être fait à un stade précoce comme 150 JPP pour évaluer le statut inflammatoire de l'utérus comme il a été déjà rapporté [41] du fait que chez les vaches indemnes d'endométrite le taux de gestation n'était pas largement différent de celui diagnostiqué à 300 JPP.

5. Conclusion

Il est clair à travers la présente partie expérimentale que l'endométrite sous ses deux formes clinique et subclinique altère de façon dramatique les performances de la reproduction de la vache dans les élevages laitiers en Algérie, en retardant la reprise de l'activité ovarienne nécessaire pour la première insémination. L'endométrite augmente aussi le nombre de jours ouverts et le nombre de services pour avoir une gestation et elle réduit le taux de gestation suite à la première insémination et le taux de gestation après 150 jours postpartum. Le faible taux de réussite de l'insémination artificielle constaté par plusieurs inséminateurs Algériens pourrait être expliqué par le fait qu'ils inséminent des vaches subcliniquement atteintes d'endométrite. De ce fait, d'autres études expérimentales sont souhaitables pour expliquer les mécanismes de l'échec de l'insémination en cas d'endométrite. Cette affection des performances de la reproduction alourdit la facture de la gestion des endométrites, en ajoutant aussi le coût direct du traitement et rejet de lait durant la période de traitement et le délai d'attente. Par conséquent, l'industrie laitière souffre d'une forte diminution de production et transformation des produits laitiers à cause des endométrites, notamment la forme subclinique. Du fait que l'Algérie souffre depuis longtemps d'une forte insuffisance de la production laitière, une étude approfondie et rationnelle sur

l'impact des endométrites sur la production laitière dans nos conditions d'élevage est devenue indispensable.

CHAPITRE 4 : OPTIMISATION D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC PRECOCE DES ENDOMETRITES

1. Introduction

Le suivi de la réaction inflammatoire dans les jours suivants le part peut représenter la clé pour comprendre et prévoir le développement d'une endométrite. De ce fait, nous aimerions développer une nouvelle technique de diagnostic basée sur l'analyse du mucus cervico-vaginal (MCV).

En raison des propriétés physiques et biochimiques spéciales du mucus, un traitement préliminaire est primordial avant toute analyse des biomarqueurs de l'inflammation. N-Acétyle-L-Cystéine (NAC) et Dithiothreitol (DTT) ou son isomère optique Dithioerythritol (DTE) sont couramment utilisés pour homogénéiser le mucus par la réduction des liaisons disulfures et empêcher leur formation entre les résidus cystéine des protéines dans le mucus [183-185]. En revanche, de nombreuses études ont démontré que ces agents d'homogénéisation affectent significativement la concentration détectable des cytokines [186, 187].

Puisque le mucus se dissout progressivement lorsqu'il est laissé dans l'eau [178, 180], le MCV peut être dilué dans du tampon phosphate salin (phosphate buffered saline : PBS) sans affecter la concentration détectable des protéines inflammatoires. Louis et al. [185] ont rapporté que le crachat de l'être humain a été traité avec succès avec du PBS afin de doser IL-8 et que les résultats étaient semblables au mucus traité par DTT. Woolhouse et al. [186] ont également confirmé que les cytokines IL-1 β , IL-6 et IL-8 ont été dosées avec succès dans le crachat humain traité uniquement avec du NaCl (chlorure de sodium).

Nous pensons que le MCV reflète l'environnement endométrial et pourrait être utilisé pour le dosage des cytokines sans l'utilisation des agents réducteurs. L'objectif principal de la présente étude est l'optimisation et le développement d'une nouvelle technique de dosage des cytokines comme IL-1 β , IL-6 et IL-8 de manière plus simple et plus sensible que la technique détaillée dans la littérature.

2. Matériel et méthodes

2.1. Etude 1 : Validité de dosage de biomarqueurs inflammatoires dans la phase soluble au cours des deux premières semaines postpartum

2.1.1. Échantillon de l'étude

Cette étude a été réalisée sur 16 vaches laitières de race Holstein provenant de la même ferme dans la république de l'Irlande (Cf. Annexe III). L'étude a initialement inclus l'enregistrement de l'historique clinique de la vache (âge, parité et facilité de vêlage), une évaluation du tractus génital en examinant l'ouverture du cervix et une évaluation de la quantité (volume) et la qualité de MCV (aspect : blanc, jaune, rouge, translucide, présence/absence de tissu placentaire résiduel, odeur fétide : oui / non) (Cf. Annexe IV-VI). Le MCV a été prélevé à l'aide d'une main gantée de 16 vaches au cours de leurs deux premières semaines postpartum, à partir duquel des frottis cytologiques ont été préparé et le mucus a été stocké dans des tubes de 20 ml et transportés dans une glacière au laboratoire (Cf. Annexe V). Les frottis cytologiques ont été utilisés pour déterminer le pourcentage de neutrophiles. Le MCV a été utilisé pour développer et optimiser une nouvelle technique pour le dosage des marqueurs inflammatoires. Tous les échantillons de MCV ont été traités selon deux protocoles différents : le protocole standard en utilisant DTT [173, 186, 215] et notre protocole modifié, en utilisant PBS. Les niveaux de la protéine totale, IL-6 et IL-8 ont été analysés et comparé entre les deux protocoles.

2.1.2. Prélèvement de MCV

L'examen vaginal et la collecte de MCV ont été effectués selon la technique développée par Williams et al. [53]. En utilisant des gants de vêlage, la queue a été levée, le périnée a été inspecté et les constatations et les anomalies ont été enregistrées. Le périnée a été essuyé avec du papier sec, ou avec de l'alcool 70% si nécessaire pour éliminer les saletés grossières et les matières fécales. Le gant de vêlage est recouvert d'un gant chirurgical propre et la main gantée a été insérée à travers la vulve dans le vagin. Les parois dorsales, latérales et ventrales du vagin et l'orifice externe du cervix ont été palpées pour déterminer l'ouverture du col et d'éventuelles anomalies. Toutes les sécrétions qui se trouvent dans le vagin ont été recueillies et retirées avec la main gantée et des scores de 0 à 3 [53] ont été donnés pour chaque

prélèvement. Le MCV a été ensuite collecté dans des tubes de 20 ml, conservé dans une glacière et transporté au laboratoire dans un délai de 4 à 6 heures.

2.1.3. Préparation de frottis cytologiques

Au moment du prélèvement de MCV, des frottis cytologiques ont été préparés à l'aide des écouvillons stériles. L'écouvillon appliqué sur la main gantée pour collecter un peu de mucus, est ensuite roulé sur une lame microscopique (Sterlin Ltd, Thermo Fisher Scientific, UK). Deux lames ont été préparées à partir de chaque prélèvement. Les lames cytologiques sont laissées sécher et transportées au laboratoire dans les 4-6h pour faire la coloration cytologique. Les lames sont ensuite colorées par le protocole Diff-Quick (Speed-Diff, Clin-Tech Limited, Essex, England) (Cf. Annexe VII). Les frottis sont ensuite examinés sous microscope (X400 de magnification) et comptabilisés toutes les cellules nucléées : neutrophiles, basophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes et cellules épithéliales (Cf. Annexe VIII).

2.1.4. Traitement de MCV

Pour optimiser le protocole d'analyse, le MCV a été traité selon deux protocoles différents. Du fait qu'il était impossible de séparer le surnageant de la phase solide de mucus après centrifugation, 500 µl de la partie supérieure du mucus après centrifugation a été recueillie et mélangée avec 1000 µl PBS stérile dans des tubes Eppendorf de 2 ml et vortexés (Cf. Figure 23). Le mucus pur et le mucus mélangé au PBS ont été stockés à -80°C jusqu'à une analyse ultérieure [210, 212, 213]. Le mucus pur était soumis à un deuxième traitement selon Healy et al. [215]. Brièvement, 2 g de mucus congelé ont été ajoutés à 10 ml de solution de cytolyte (méthanol 40% : eau distillée 60%) et mélangés avec 1 mM DTT pour homogénéiser le mucus. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 x g pendant 15 min à 4 °C et les surnageants ont été recueillis et des aliquotes de 1 ml ont été préparées et stockées à -80 °C.

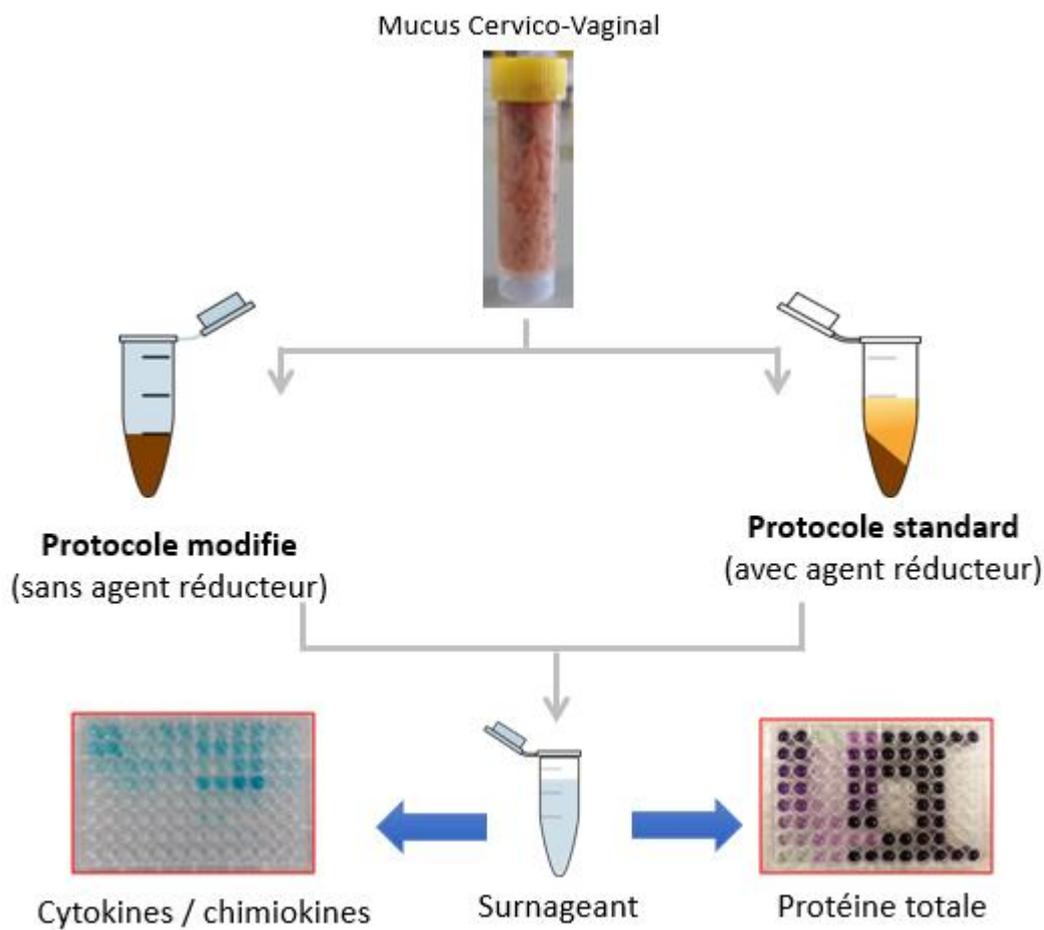


Figure 23 : Représentation schématique de méthodes de traitement de MCV pour l'analyse de protéine totale et le dosage des cytokines et chimiokines.

2.1.5. Dosage de la protéine totale

Pour déterminer la concentration d'IL-8 et d'IL-6 par mg de protéines de mucus, la concentration de protéine totale a été mesurée par la technique BCA en utilisant le kit de dosage de protéines Pierce™ BCA (# 23227, ThermoScientific®, 3747 N. Meridian Road Rockford, IL 61101, États-Unis) (Cf. Annexe IX et X). Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA).

2.1.6. Dosage de l'interleukine IL-8

Les concentrations d'IL-8 dans MCV ont été évaluées en utilisant un kit ELISA IL-8 humain commercialement prêt à l'emploi (R & D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) selon les directives fournies par le fabricant et modifiées selon Kim et al.[213] et Foley et al. [171]. Après

décongélation, le mucus mélangé au PBS a été centrifugé à 3000 x g pendant 15 min à 4 °C et le surnageant a été utilisé pour le dosage d'IL-8. Le surnageant recueilli à partir de mucus mélangé à la DTT a été utilisé directement pour le dosage d'IL-8.

2.1.7. Dosage de l'interleukine IL-6

La concentration d'IL-6 a été mesurée en utilisant un kit ELISA IL-6 bovin (# ESS0029, ThermoScientific®, 3747 N. Meridian Rd. Rockford, IL 61101, États-Unis) (Cf. Annexe XI et XII). Des échantillons ont été préparés comme décrit précédemment pour IL-8. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA).

2.2. Etude 2 : Optimisation de la nouvelle technique d'analyse de MCV postpartum

2.2.1. Identification du troupeau et collecte des échantillons

Parmi les échantillons recueillis dans l'étude 1, un animal à sa première semaine postpartum a été sélectionné pour préparer une dilution en série de mucus en utilisant deux agents réducteurs DTT et N-acétyl-L-cystéine. Le mucus traité est alors soumis à un dosage de la protéine totale et l'électrophorèse SDS-PAGE pour démontrer quel est le protocole donnant une meilleure détection de la protéine totale et quelles sont les protéines qui ont le poids moléculaire proche de celui de cytokines / chémokines.

2.2.2. Traitement de MCV

Pour optimiser le protocole d'analyse de mucus du postpartum, MCV de cette vache a été traitée selon différents protocoles. Principalement, trois groupes de protocoles ont été réalisés avec (Cf. Figure 24) ;

- Mucus + PBS + NAC +/- méthanol
- Mucus + PBS + DTT +/- méthanol
- Mucus + PBS +/- méthanol

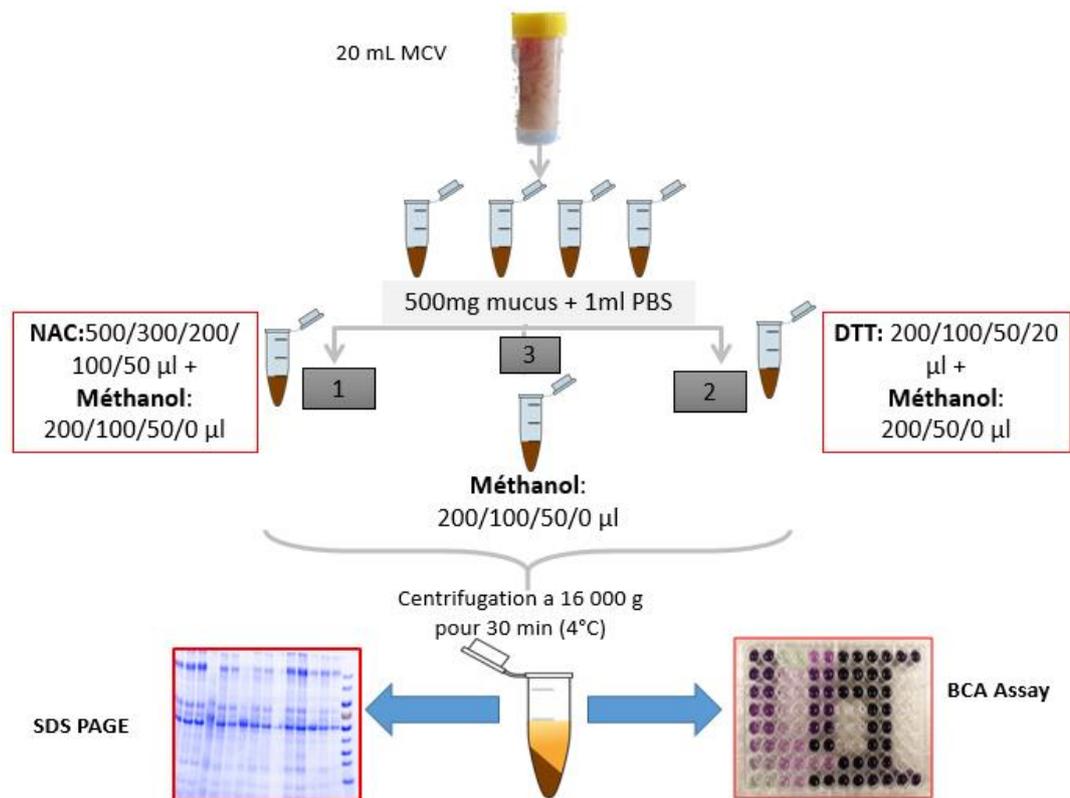


Figure 24: Représentation schématique de méthodes de traitement du MCV pour l'optimisation de méthode d'analyse de protéine totale (BCA Assay). La séparation des protéines s'est faite selon leurs poids moléculaire par SDS PAGE.

2.2.2.1. Traitement du MCV avec NAC

Les prélèvements du MCV ont été procédés selon un protocole modifié, décrit par Saraswathy Veena et al. [184]. Vingt (20) aliquotes de tout le mucus congelé pesant approximativement 500 mg chacun, ont été mélangées avec 1000 μ l de PBS dans des tubes de 5 ml. Différentes quantités de 1M NAC (% de volume final) : 50 (3,3%), 100 (6,7%), 200 (13,3%), 300 (20%) ou 500 μ l (33,3%) ont été ajoutés à chaque tube. Ensuite, à chaque tube ont été ajouté 0 (0%), 50 (5%), 100 (10%) ou 200 μ l (20%) de méthanol pur (Cf. Annexe XIII et XIV). Les tubes ont ensuite été soumis à un vortex pendant 30 secondes et incubés à température ambiante pendant 30 minutes. Les tubes ont ensuite été incubés pendant une nuit à 4 ° C après avoir été soumis à un vortex pendant 30 secondes. Les échantillons traités ont ensuite été centrifugés à 4 ° C pendant 30 minutes et le surnageant a été recueilli et aliquoté dans deux tubes Eppendorf et stocké à -80 ° C pour une analyse ultérieure.

2.2.2.2. Traitement du MCV avec DTT

Puisque la DTT est un agent réducteur plus puissant que le NAC, des quantités plus faibles de 1M de DTT ont été utilisées. En général, le mucus a été traité de la même manière qu'avec NAC, selon Healy et al. [215] avec modification. En bref, 12 aliquotes de mucus entier congelé de 500 mg ont été mélangées avec 1000 µl de PBS dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Différentes quantités de 1M de DTT (% de volume final) ; 20 (1,3%), 50 (3,3%), 100 (6,7%) ou 200 µl (13,3%) ont été ajoutés à chaque tube. Ensuite, nous avons ajouté 0 (0%), 50 (5%) ou 200 µl (20%) de méthanol à 100% (Cf. Annexe XIII et XIV). Les tubes ont ensuite été traités comme nous avons précédemment détaillé pour le NAC.

2.2.2.3. Traitement du MCV sans agent réducteur

A partir du mucus congelé, 4 aliquotes de 500 mg ont été mélangées avec 1000 µl de PBS et 0 (0%), 50 (5%), 100 (10%) ou 200 µl (20%) de méthanol à 100% ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été traités comme dans NAC et DTT (Cf. Annexe XIII et XIV).

2.2.3. Analyse de protéine totale dans le MCV

Pour déterminer la concentration de protéine totale obtenue par chaque protocole, nous avons utilisé l'essai d'acide bicinchoninique (BCA Assay) selon les directives de fabrication. Des standards de protéine ont été préparés en utilisant de l'albumine de sérum de bovin (BSA) et les concentrations finales (µg / ml) de BSA suivantes : 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 et 0 ont été préparées. Tous les standards et les échantillons ont été analysés en double et la plaque a été analysée à l'aide de spectrophotomètre à une longueur d'onde de 562 nm. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, Suite 230 La Jolla, ça 92037 USA).

2.2.4. Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. Pour cibler une large gamme de protéines dans le mucus, nous avons choisi un gel de séparation de gradient 4-20% (gradient separating gel) et un gel de concentration de 5% (stacking gel) (Cf. Annexe XIV). Pour ne pas masquer l'effet de l'agent réducteur ajouté au mucus, les échantillons ont été chargés dans une cassette de gel en utilisant un tampon de charge non réducteur (non-

reducing loading buffer). Les gels sont passés entre 110 volts pendant 1 h 30 et colorés par la suite avec du bleu de Coomassie G250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) (#23236, Rockford, Illinois 61105 USA) pendant une heure sous agitation douce. Après une nuit de décoloration à 4°C, les gels ont été scannés et interprétés.

2.3. Etude 3 : Validité de dosage des biomarqueurs inflammatoires dans le MCV des animaux indemnes d'endométrite.

2.3.1. Identification du troupeau et collecte des échantillons

Les MCV de 5 vaches en œstrus ont été collectés, mélangés et traités avec un agent réducteur NAC ou DTT ou sans agent réducteur, comme nous avons décrit précédemment dans l'étude 2, avec quelques modifications. Le mucus traité a été soumis à la mesure de la protéine totale, à l'électrophorèse SDS-PAGE et au dosage de l'IL-1 β pour montrer le meilleur protocole de traitement de mucus pour le dosage de niveau de cytokines et protéine totale chez les animaux indemnes d'endométrite.

2.3.2. Traitement de MCV

Comme décrit dans l'étude 2, les mucus ont été traité selon trois groupes de protocoles (Cf. Figure 25) ;

- Mucus + PBS + NAC +/- méthanol
- Mucus + PBS + DTT +/- méthanol
- Mucus + PBS +/- méthanol

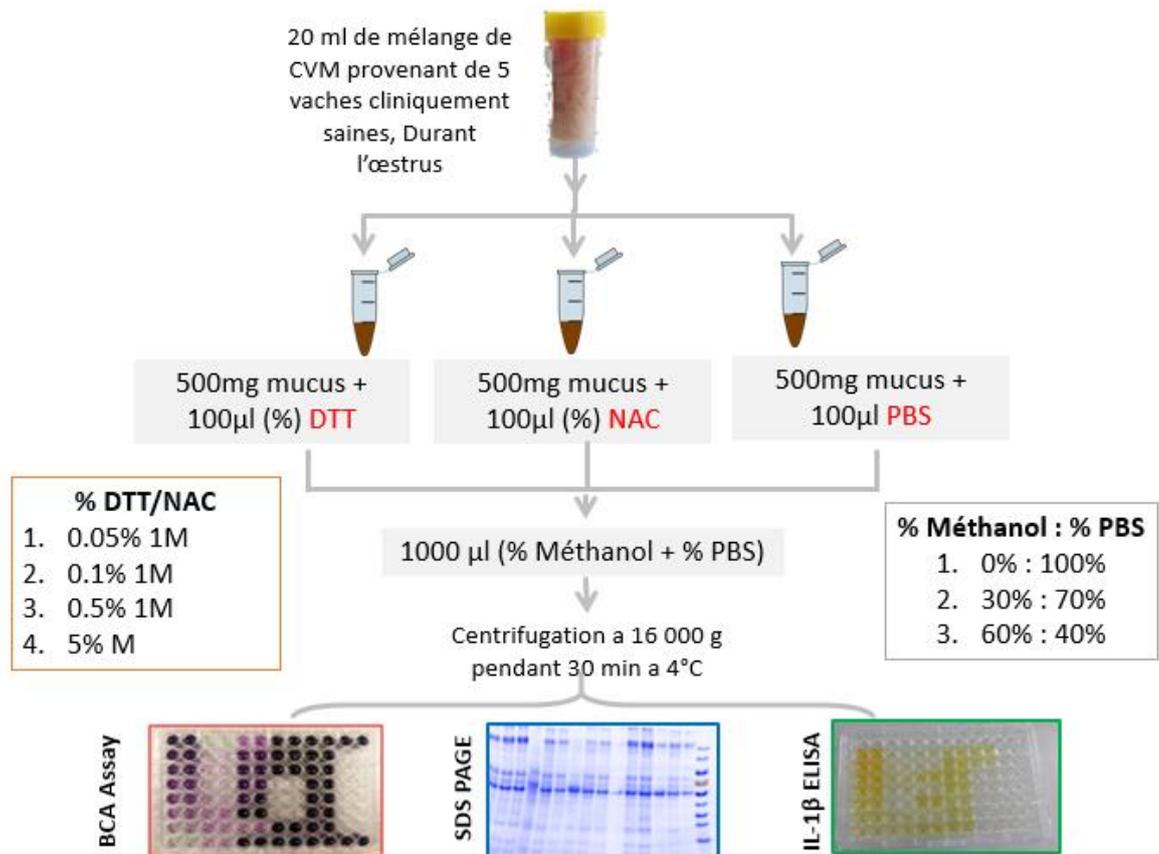


Figure 25 : Représentation schématique de méthodes de traitement de MCV des vaches saines, collectés durant l'œstrus, en dehors du postpartum pour l'optimisation de méthode d'analyse de protéine totale (BCA Assay). La séparation des protéines selon leurs poids moléculaire s'est faite par SDA PAGE.

2.3.2.1. Traitement du MCV avec DTT/NAC

En bref, 24 aliquotes du mélange de mucus congelé pesant approximativement 500 mg ont été préparées et mélangées avec 100 µl de NAC / DTT 1M à 0,05%, 0,1%, 0,5% ou 5%. Après vortex pendant 30 secondes, nous avons ajouté 1000 µl de méthanol à 0%, 30% et 60% et vortexer pendant 30 secondes (Cf. Figure 25). Les tubes ont été centrifugés à 16 000 g pendant 30 minutes à 4 ° C. Le surnageant a été utilisé pour le dosage de la protéine totale par la technique de BCA, l'électrophorèse SDS-PAGE et dosage de l'IL-1β par ELISA.

2.3.2.2. Traitement du MCV sans agent réducteur

A partir du mélange de mucus congelé 3 aliquotes de 500 mg de mucus et 100 µl de PBS et 1000 µl de méthanol à 0%, 30% ou 60% ont été préparés. Les échantillons ont été

centrifugés à 16 000 g pendant 30 minutes à 4 ° C puis traités comme dans le NAC et DTT (Cf. Figure 25).

2.3.3. Analyse de protéine totale dans le MCV et électrophorèse SDS PAGE

Le dosage de la protéine totale et l'électrophorèse SDS PAGE ont été réalisées comme nous avons détaillé précédemment dans l'étude 2.

2.3.4. Dosage d'IL-1 β

La concentration d'IL-1 β a été mesurée dans chaque échantillon de chaque protocole en utilisant un kit ELISA IL-1 β bovin (# ESS0027, ThermoScientific®, 3747 N. Meridian Rd Rockford, IL 61101, États-Unis) en suivant les instructions fournies par le fabricant (Cf. Annexe XV). Les échantillons ont été centrifugés à 16 000 g pendant 30 minutes à 4 ° C et le surnageant a été utilisé pour le dosage d'IL-1 β par ELISA. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA).

2.4. Analyse statistique

Les résultats sont présentés par la moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). L'analyse statistique et les graphes ont été effectués en utilisant le logiciel GraphPad® Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA). Les résultats entre les groupes ont été comparés avec le test de *t*-Student. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à une valeur de $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Etude 1 : Validité de dosage de biomarqueurs inflammatoires dans la phase soluble au cours des deux premières semaines postpartum

3.1.1. La cytologie de MCV

Des frottis cytologiques ont été préparés pour la détermination du pourcentage de neutrophiles et les résultats sont résumés dans le tableau 30 et figures 25-28 (Cf. Annexe VIII).

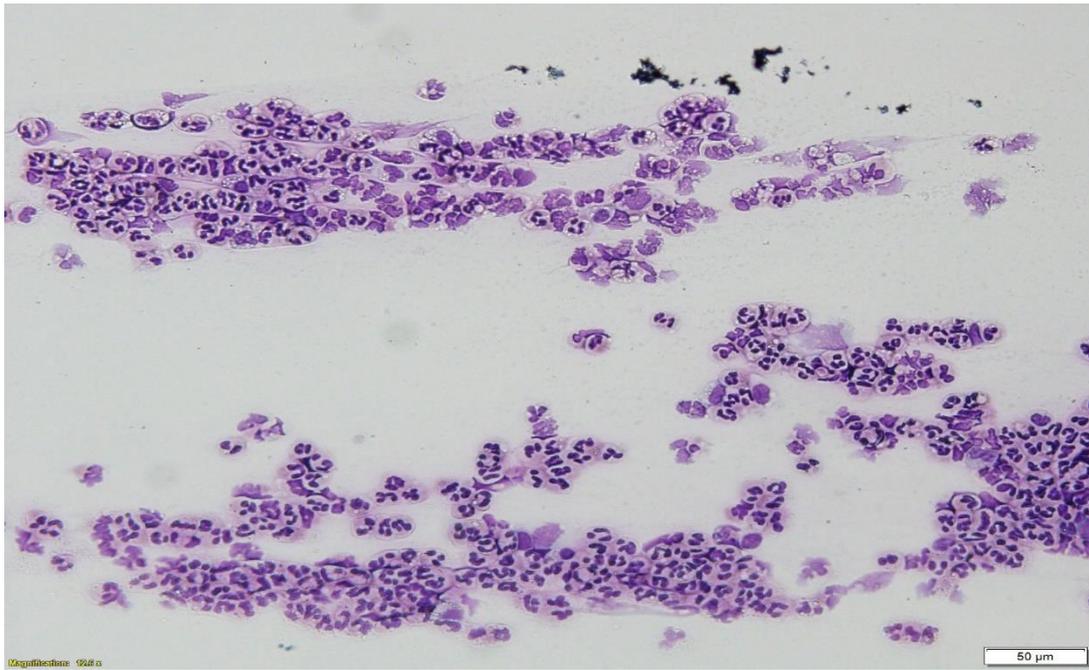


Figure 26: Image microscopiques de MCV représentant une forte population de neutrophiles indiquant une inflammation sévère. Barre = 50 um (x20)

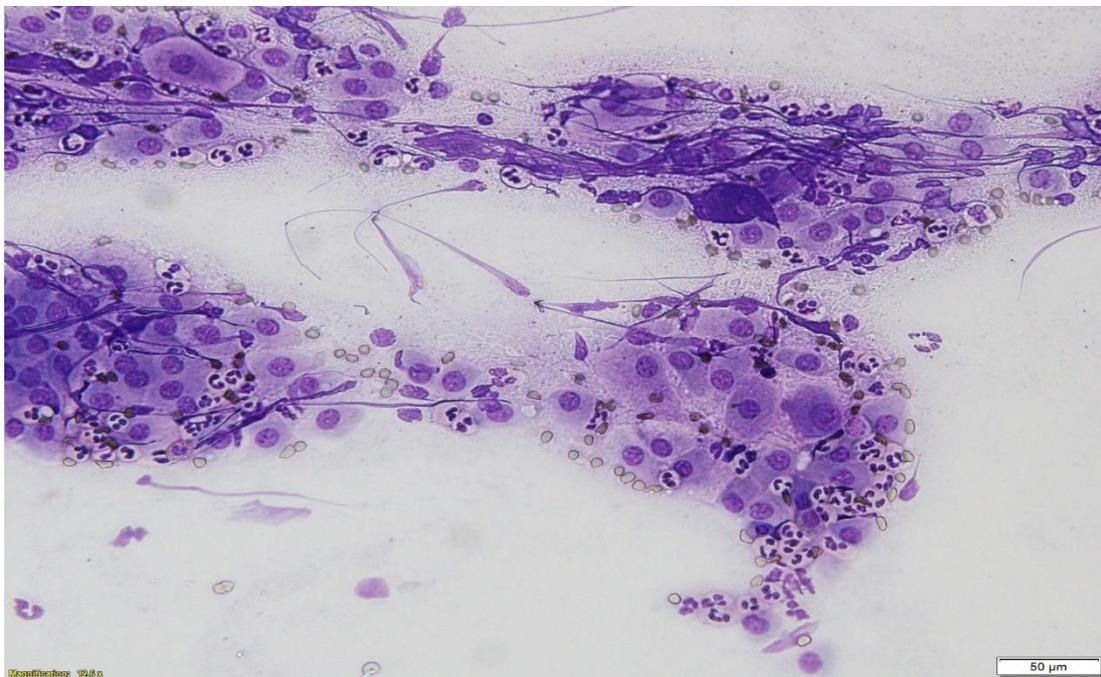


Figure 27: Image microscopiques de MCV représentant une légère population de neutrophiles et cellules épithéliales indiquant une inflammation modérée. Longueur de la Barre = 50 um (x20)



Figure 28: Image microscopiques de MCV représentant un macrophage infestant une neutrophile. Longueur de la barre = 10 m (x40)

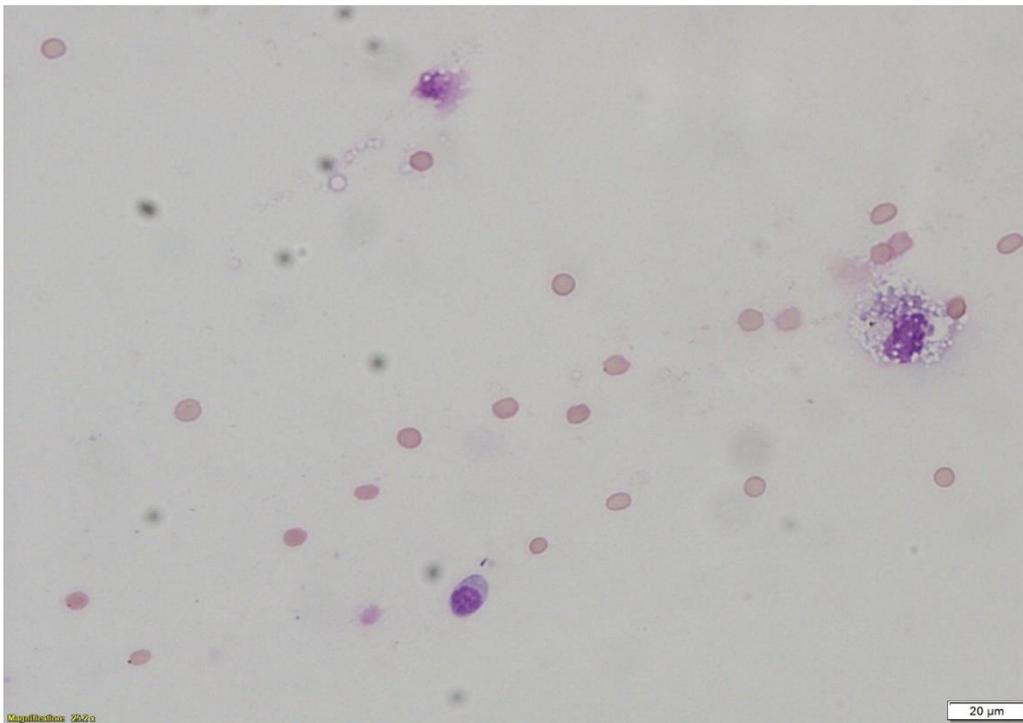


Figure 29: Image microscopique de MCV représentant un macrophage et une lymphocyte. Bare= 20 um (x20)

Tableau 30 : Pourcentage de polynucléaires neutrophiles (PNN) et le ratio PNN sur les cellules épithéliales pour chaque vache durant les deux premières semaines postpartum.

Vache	% PMN	Ration PMN/cellules épithéliales
1	70%	123/6
2	90%	237/2
3	95%	278/1
4	98%	243/3
5	38%	73/83
6	71%	149/0
7	14%	23/133
8	88%	206/3
9	78%	176/30
10	84%	326/39
11	50%	148/107
12	89%	181/5
13	100%	235/0
14	45%	58/47
15	100%	232/0
16	96%	361/3

3.1.2. Dosage de protéine totale

Le mucus mélangé au DTT a donné une concentration détectable de la protéine totale relativement élevée ($P < 0.0001$) par rapport au mucus traité avec PBS (Cf. Tableau 31 et Figure 30).

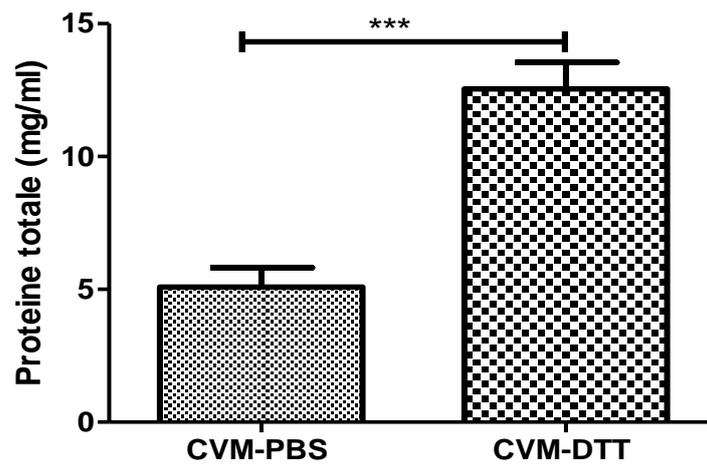


Figure 30: Comparaison entre la concentration de la protéine totale dans le mucus cervico-vaginal traité par PBS ou DTT. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). La différence est significative *** $P < 0.0001$.

Tableau 31 : Concentration de protéine totale (mg/ml de mucus) dans le MCV traité avec 1 mM DTT (MCV-DTT) ou PBS (MCV-PBS) en utilisant la technique de BCA.

Vache	Protéine totale (mg/ml)	
	MCV-PBS	MCV-DTT
1	1.2	10.8
2	9.2	17.0
3	6.0	12.6
4	4.1	7.8
5	1.5	18.6
6	5.4	14.4
7	2.3	8.7
8	3.8	9.7
9	9.4	15.8
10	4.2	15.3
11	8.5	9.7
12	3.0	13.9
13	7.5	12.9
14	4.2	8.0
15	9.5	19.2
16	1.5	6.3

3.1.3. Dosage d'IL-8 et IL-6

Les résultats de la concentration d'IL-8 et IL-6 dans le mucus pour chaque animal sont résumés dans le tableau 32. Le MCV mélangé avec PBS a donné une détectable concentration d'IL-8 plus élevée que le MCV traite avec DTT ($P < 0,001$). Comme IL-8, IL-6 été hautement détectable dans le mucus traité avec PBS par rapport au mucus traité avec DTT ($P < 0,001$).

En prenant en considération la quantité de protéine totale dans chaque échantillon de MCV, les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 par mg de protéine totale étaient plus élevées dans le MCV traité avec PBS que dans le protocole qui utilise la DTT ($P < 0,001$) (Cf. Figure 31).

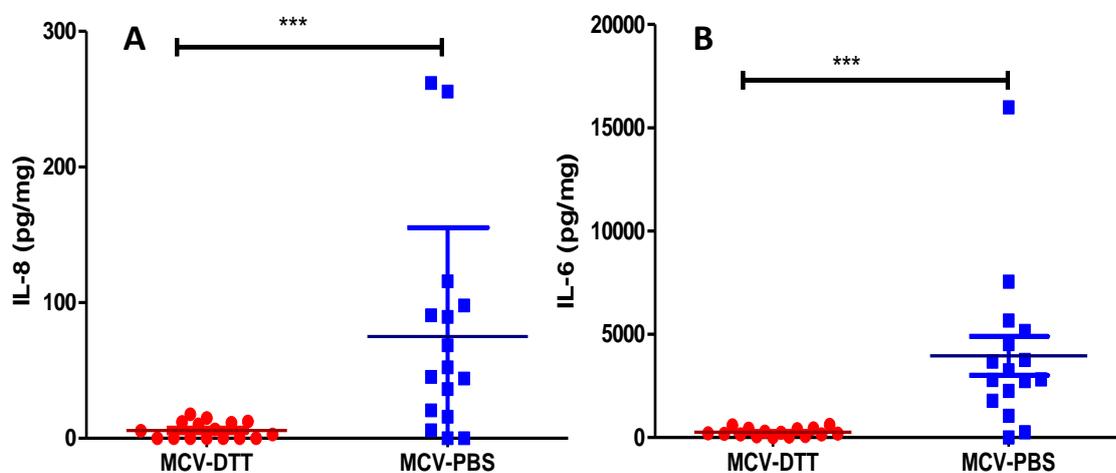


Figure 31: Représentation graphique de la concentration d'IL-8 (A) et IL-6 (B) dans le MCV collecté durant les deux premières semaines postpartum et traité par DTT ou PBS. *** $P < 0.001$.

Tableau 32: concentration d'IL-8 et d'IL-6 (pg/ml de mucus) dans le MCV traité avec 1 mM DTT (MCV-DTT) ou avec PBS (MCV-PBS).

Vache	IL-8 (pg/ml de mucus)		IL-6 (pg/ml de mucus)	
	MCV-PBS	MCV-DTT	MCV-PBS	MCV-DTT
1	313.9	71.1	9 268.6	3 089.4
2	-	193.8	-	3 365.9
3	35.2	0.0	16 861.6	5 018.1
4	370.5	94.0	15 030.6	3 508.2
5	398.6	0.0	24 340.3	406.9
6	0.0	0.0	1 412.6	939.6
7	201.7	24.4	4013.9	2 072.4
8	60.6	0.0	1 7297.5	5 998.5
9	426.2	89.8	26 274.2	1 140.8
10	408.0	157.1	21 488.1	2 339.5
11	176.9	0.0	8 948.3	1 527.0
12	349.9	245.7	2 803.5	2 803.5
13	330.0	193.4	7 545.4	7 545.4
14	217.3	0.0	3 424.0	3 424.0
15	343.4	238.4	3 344.8	3 344.8
16	102.8	0.0	264.0	264.0

3.2. Etude 2 : Optimisation de la nouvelle technique d'analyse de MCV postpartum

3.2.1. Dosage de protéine totale

La quantité de NAC n'affecte pas la concentration détectable de la protéine totale sauf si la quantité est supérieure à 200 µl de NAC soit 20% du volume final du mélange ($P < 0.001$). De même, DTT n'affecte pas la quantité de protéine totale détectée par la technique BCA, mais après l'ajout de 200 µl de DTT soit (13.3 %) du volume final de mélange, il n'était pas possible de détecter les protéines par la technique de BCA (Cf. Figure 32). La quantité ajoutée de méthanol n'avait pas d'effet sur la concentration détectable de protéine totale quel que soit l'agent réducteur utilisé ($P > 0,33$) (Cf. Figure 33).

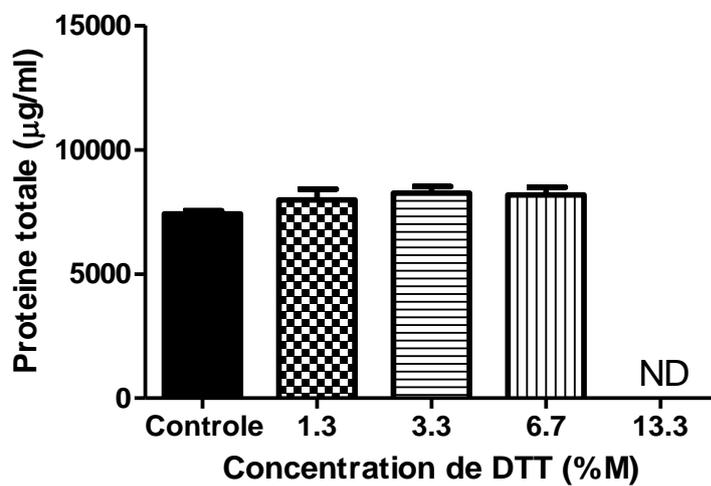
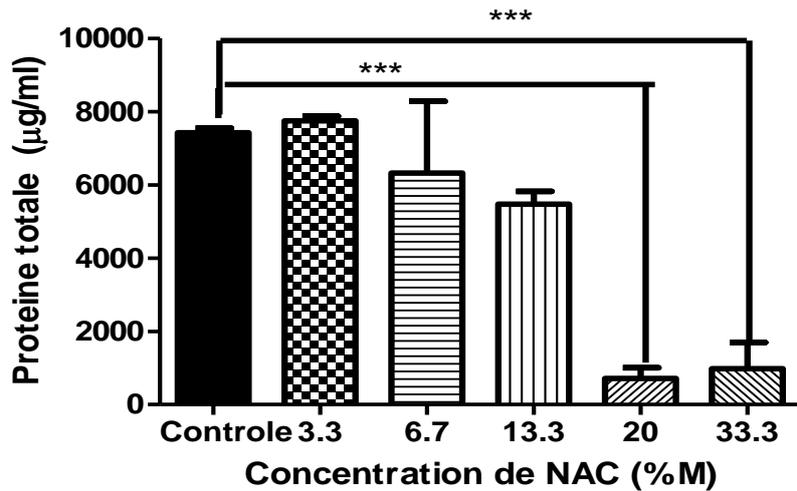


Figure 32 : Corrélation entre les concentrations de NAC (A) et DTT (B) ajouté au mucus du postpartum précoce et la concentration détectable de protéine totale en utilisant la technique de BCA. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). La différence avec le contrôle (0 μ l de NAC/DTT) est significative à $***P < 0.001$.

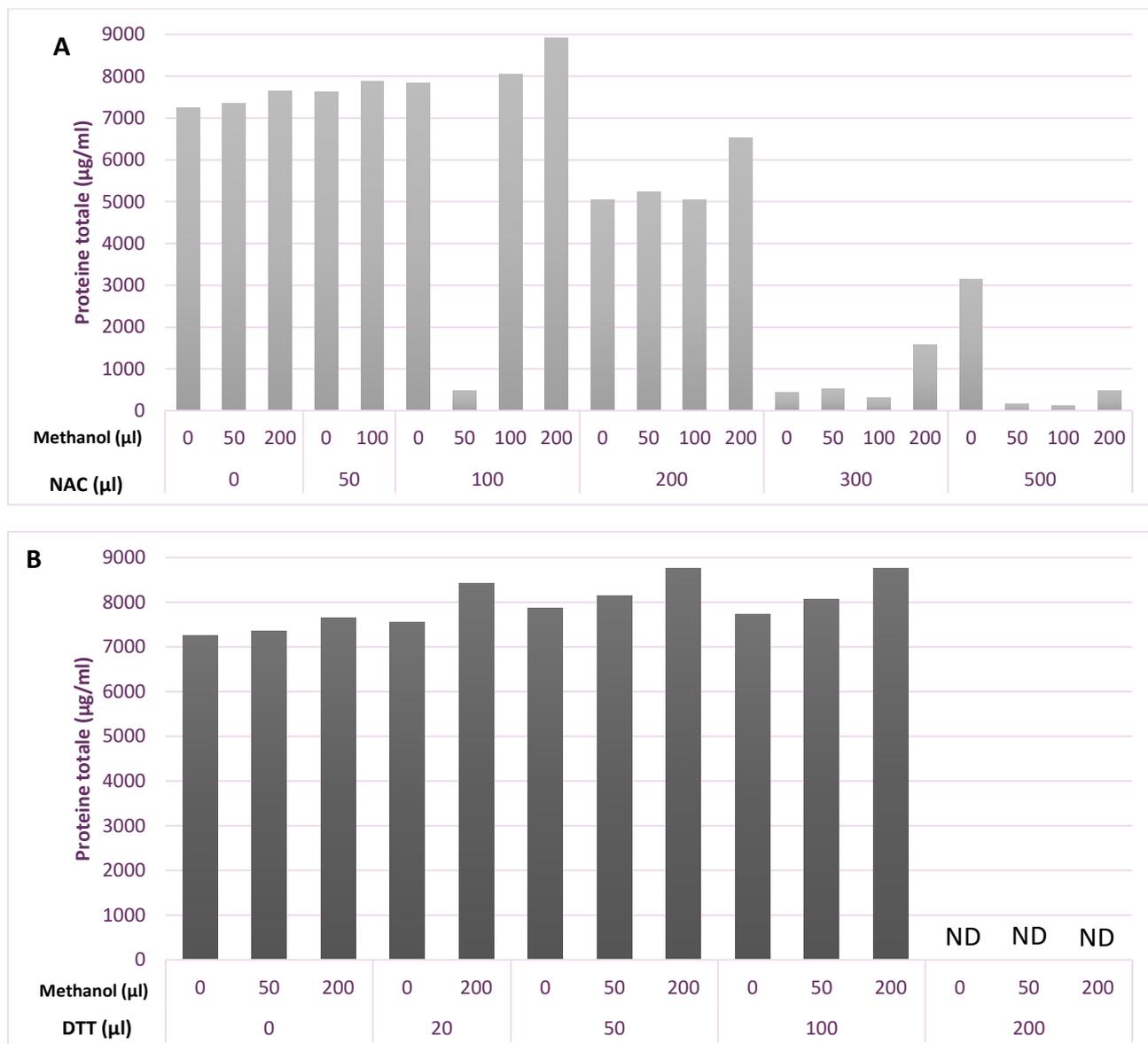


Figure 33: l'effet de l'ajout de méthanol sur la concentration détectable de la protéine totale, en fonction de l'agent réducteur ajouté NAC (A), DTT (B) ou sans agent réducteur (0 µl).

3.2.2. Electrophorèse SDS-PAGE

En utilisant le gel de gradient, il a été possible de montrer la migration des bandes de protéine de tailles différentes allant de grande (> 130KDa) à petit poids moléculaire (<15KDa). En général, les échantillons semblent très riches en protéines et les protéines les plus abondantes dans toutes les échantillons sont celles qui sont 55 KDa de poids moléculaire. Cependant, pour montrer quel protocole donne une meilleure séparation des protéines qui ont le poids moléculaire dans le rang de cytokines / chimiokines ciblées (Cf. Figure 34), les

protocoles ont été comparés sur la base de pouvoir de séparation des bandes de protéines dans le rang de 10-35KDa et les résultats sont résumés dans les figures 35 et 36.

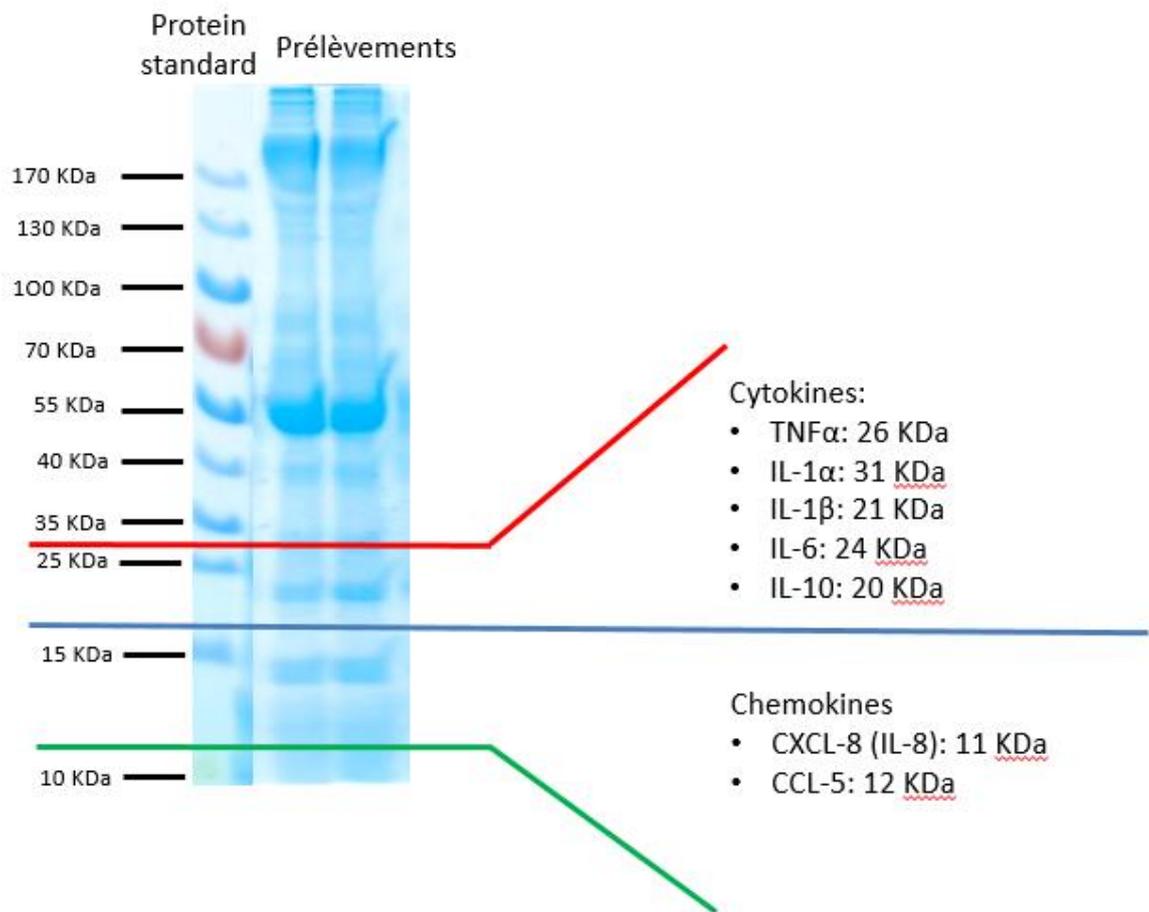


Figure 34: représentation schématique de la migration de la protéine standard et des échantillons dans un gel de gradient à 4-20%, et le poids moléculaire des principaux marqueurs inflammatoires qui sont en relation avec l'endométrite.

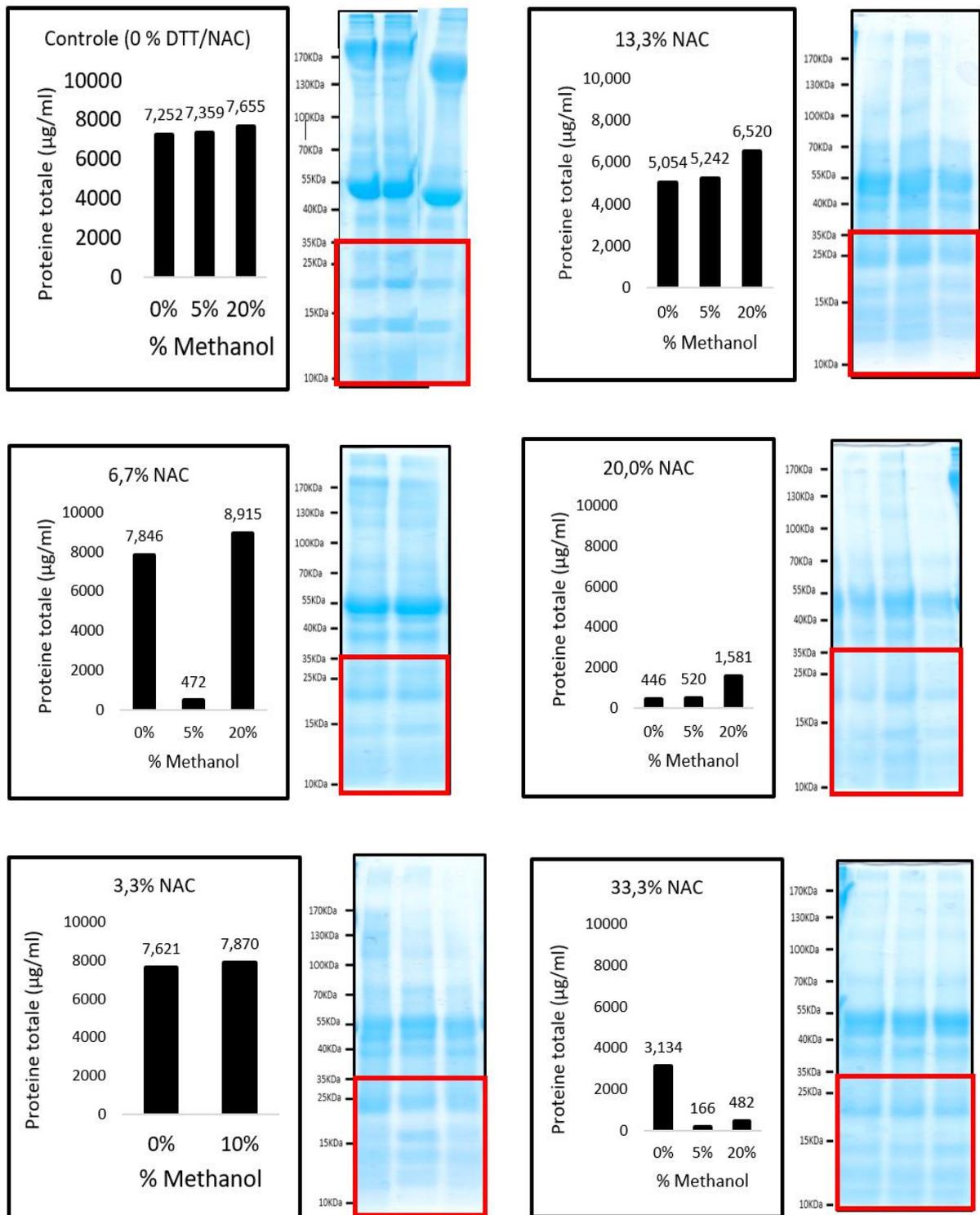


Figure 35: comparaison entre les résultats de la protéine totale et la SDS-PAGE en utilisant le NAC comme agent réducteur dans le mucus collecté durant les deux premières semaines postpartum. La boîte rouge représente le rang de poids moléculaire des cytokines et chimiokines ciblées.

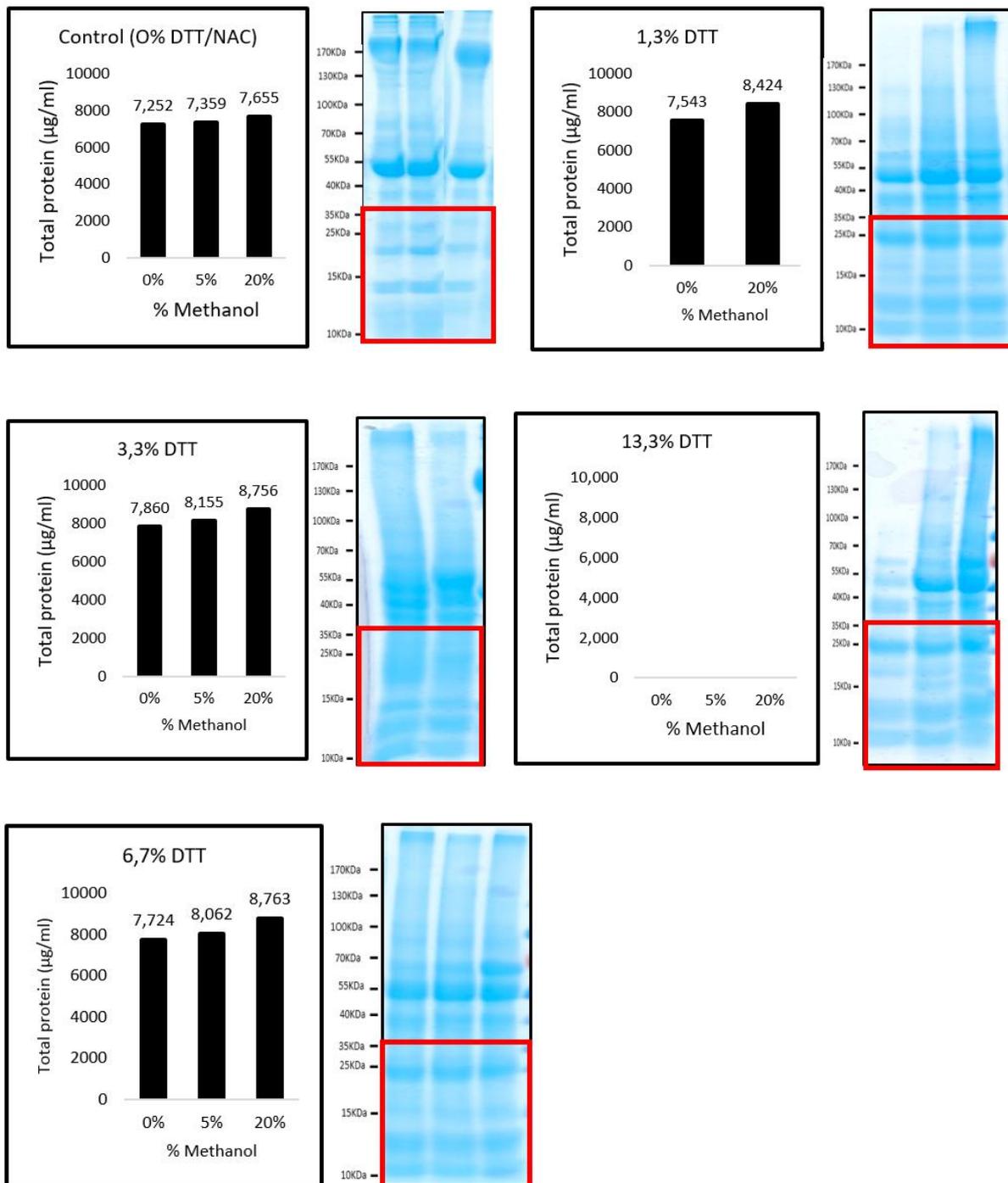


Figure 36: comparaison entre les résultats de la protéine totale et la SDS-PAGE en utilisant le DTT comme agent réducteur dans le mucus collecté durant les deux premières semaines postpartum. La boîte rouge représente le rang de poids moléculaire des cytokines et chimiokines ciblées.

Le mucus traité sans aucun agent réducteur donne un meilleur profil protéique avec une séparation nette des bandes sur SDS-PAGE en particulier dans la gamme de 10-35 KDa, le rang de poids moléculaire qui englobe les cytokines et les chimiokines. En outre, le traitement du mucus sans agent donnait une meilleure séparation des protéines de large poids moléculaire (> 130 KDa).

3.3. Etude 3 : validité de dosage des biomarqueurs inflammatoires dans le MCV des animaux sains durant l'œstrus

Du fait que le mucus du postpartum précoce est complètement différent dans la composition et les propriétés physicochimiques en comparant du mucus collecté à un stade ultérieur, le MCV recueilli pendant la phase d'œstrus a été traité par les mêmes agents réducteurs que nous l'avons déjà utilisé pour le traitement de MCV de postpartum précoce. L'objectif de cette partie c'était de montrer si le stade du postpartum affecte le résultat de traitement de mucus en vue de l'analyse de la protéine totale et les biomarqueurs inflammatoires en relation avec l'endométrite.

3.3.1. Dosage de la protéine totale

Les résultats de la concentration de la protéine totale sont résumés dans la figure 37. La concentration de NAC n'affecte pas de manière significative la concentration détectable de protéine totale (Cf. Figure 37). La DTT n'affecte pas les résultats de la protéine totale sauf si sa concentration est > 5% M. La concentration de DTT généralement utilisée dans la littérature (0.1% M) donne une détectable concentration de protéine totale significativement identique au contrôle (Cf. Figure 37.B).

En général, la concentration de méthanol ajoutée au mucus n'affecte pas la concentration détectable de la protéine totale, sauf avec 5% de NAC où le méthanol 0% est meilleur que 30% pour mesurer la protéine totale ($P < 0,05$) (Cf. Figure 38). Même si la différence n'était pas significative, traiter le mucus sans méthanol est beaucoup plus pratique pour le dosage de la protéine totale par la technique BCA.

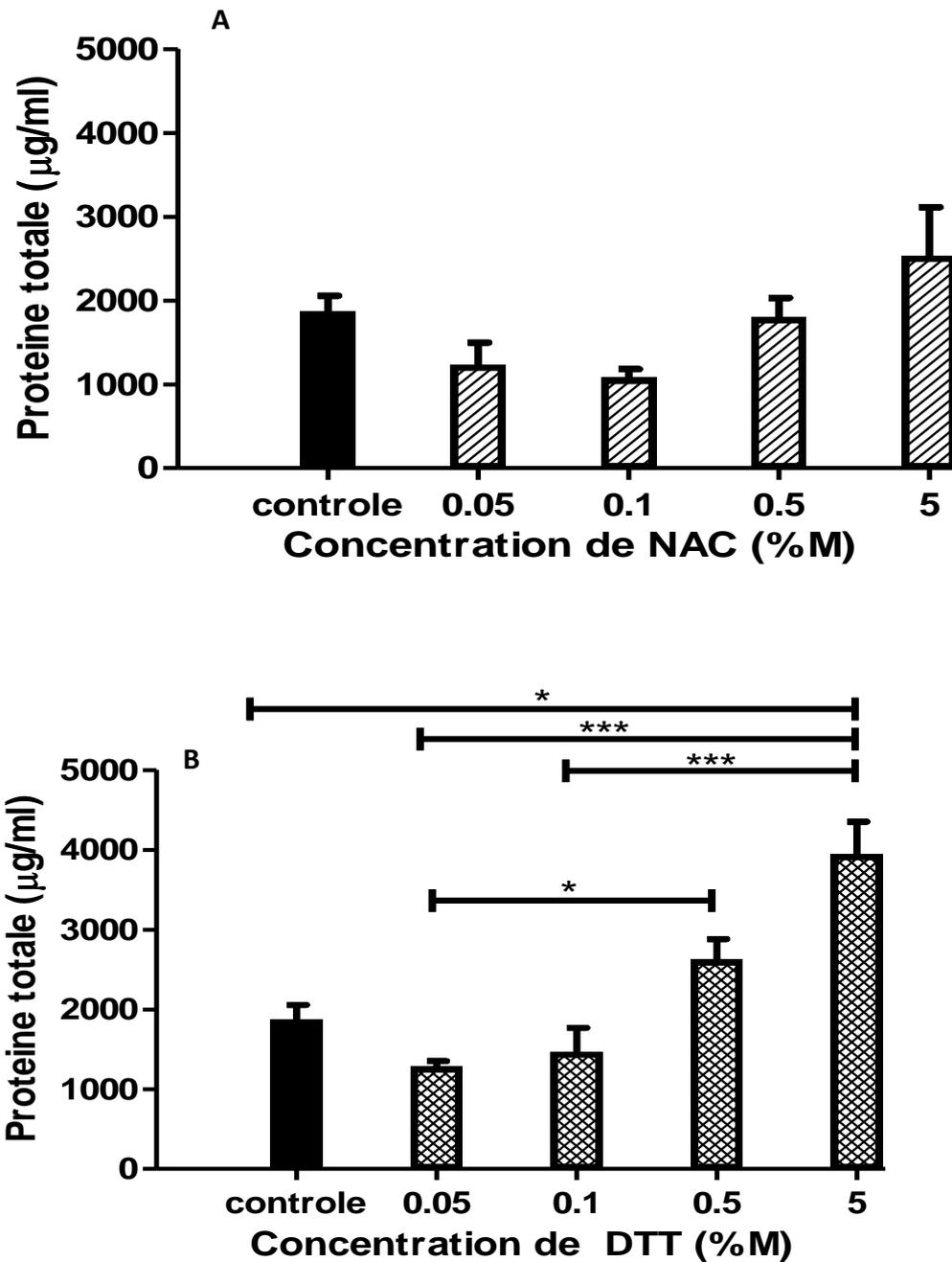


Figure 37: Corrélation entre les concentrations de NAC (A) et de DTT (B) ajoutées au MCV collectée durant l'œstrus et la détectable concentration de la protéine totale en utilisant la technique BCA (moyenne \pm SEM). La différence entre les protocoles est significative a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

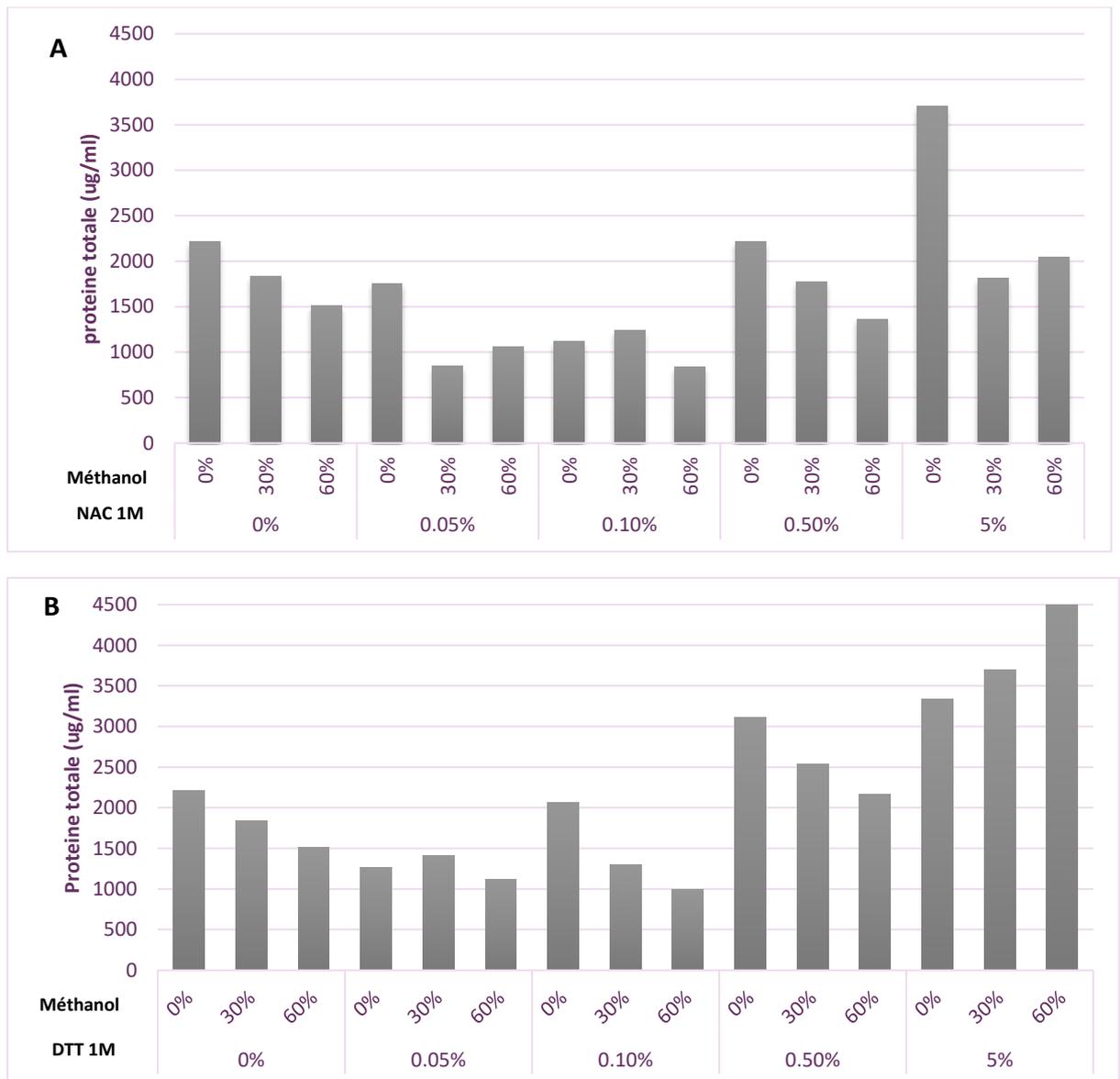


Figure 38: L'effet de l'ajout de méthanol sur la concentration détectable de la protéine totale, en fonction de l'agent réducteur utilisé NAC (A), DTT (B) ou sans agent réducteur (0 µl) dans le MCV collecté durant l'œstrus au postpartum tardif.

3.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE

Les échantillons sont soumis à un tampon de chargement non réducteur pour ne pas masquer l'effet de l'agent réducteur utilisé pour le traitement du MCV (Cf. Figures 39 et 40). En général, les échantillons semblent pauvres en protéines et les protéines communes abondantes sont celles avec 55, 70 et 170KDa de poids moléculaire. Encore une fois, le mucus traité sans aucun agent réducteur donne une meilleure séparation des bandes de protéine dans la gamme de poids moléculaire des cytokines et chimiokines ciblées (boîte rouge).

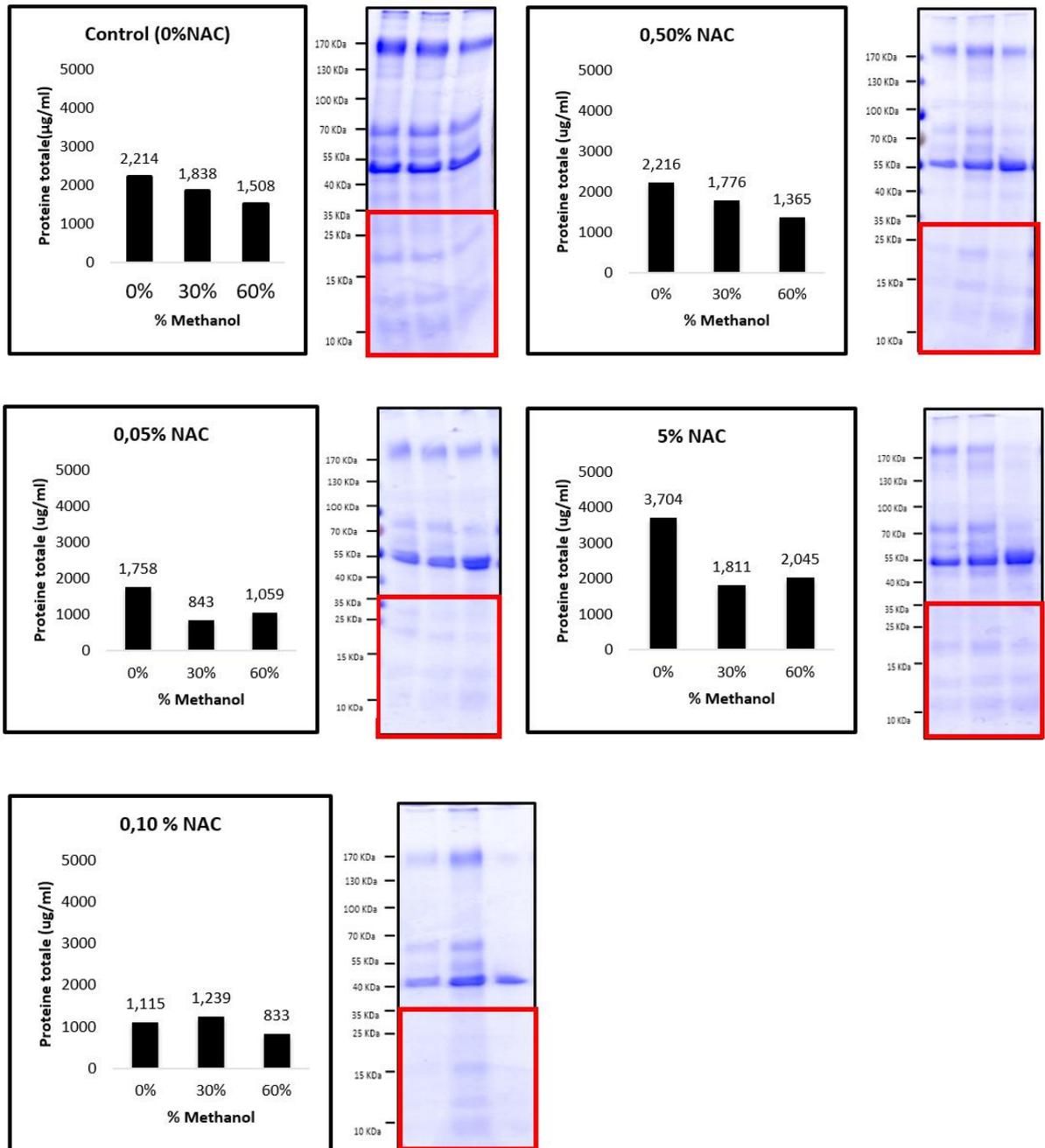


Figure 39: Comparaison entre les résultats de la protéine totale et la SDS-PAGE en utilisant le NAC comme agent réducteur dans le mucus collecté durant l'œstrus plus tard au postpartum. La boîte rouge représente le rang de poids moléculaire de cytokines et chimiokines ciblées.

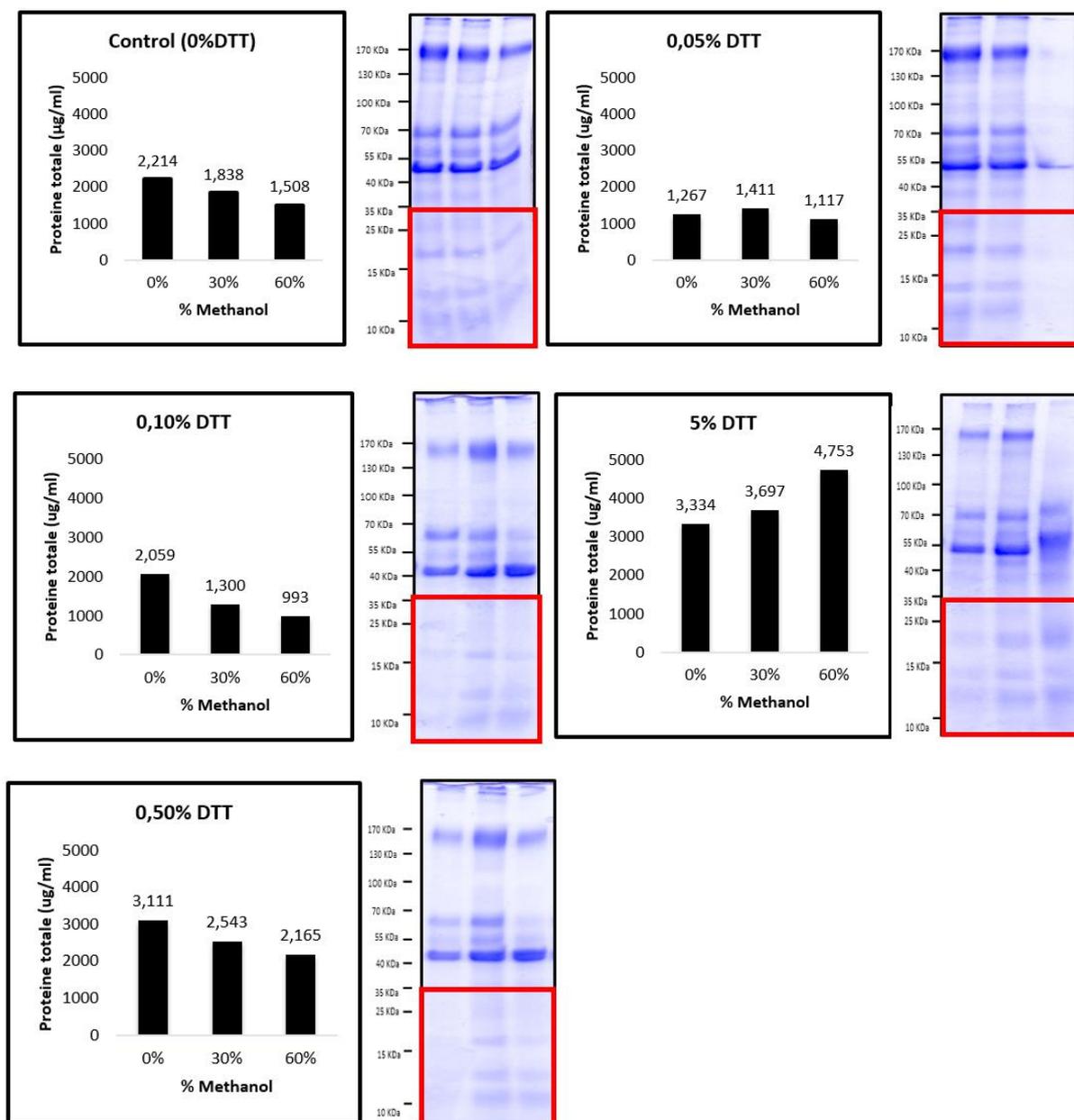


Figure 40: comparaison entre les résultats de la protéine totale et la SDS-PAGE en utilisant le DTT comme agent réducteur dans le mucus collecté durant l'œstrus plus tard au postpartum. La boîte rouge représente le rang de poids moléculaire de cytokines et chimiokines ciblées.

3.3.3. Dosage d'IL-1 β

En mesurant la concentration de l'IL-1 β par ml de mucus, nous avons constaté que NAC et DTT n'affectent pas le niveau détectable d'IL-1 β quelle que soit la dose utilisée (Cf. Figure 41).

En interprétant les résultats par mg de protéine totale, nous avons trouvé que NAC a augmenté la concentration détectable de l'IL-1 β , en particulier à une concentration de 0,05-0,5 % de NAC (Cf. Figure 41). En revanche, le MCV traité par DTT ne donne pas de résultats significativement différents par rapport à l'échantillon de contrôle (0% DTT ou 0% NAC) et l'augmentation de la concentration de DTT ajoutée au MCV diminue la concentration détectable d'IL-1 β (Cf. Figure 41).

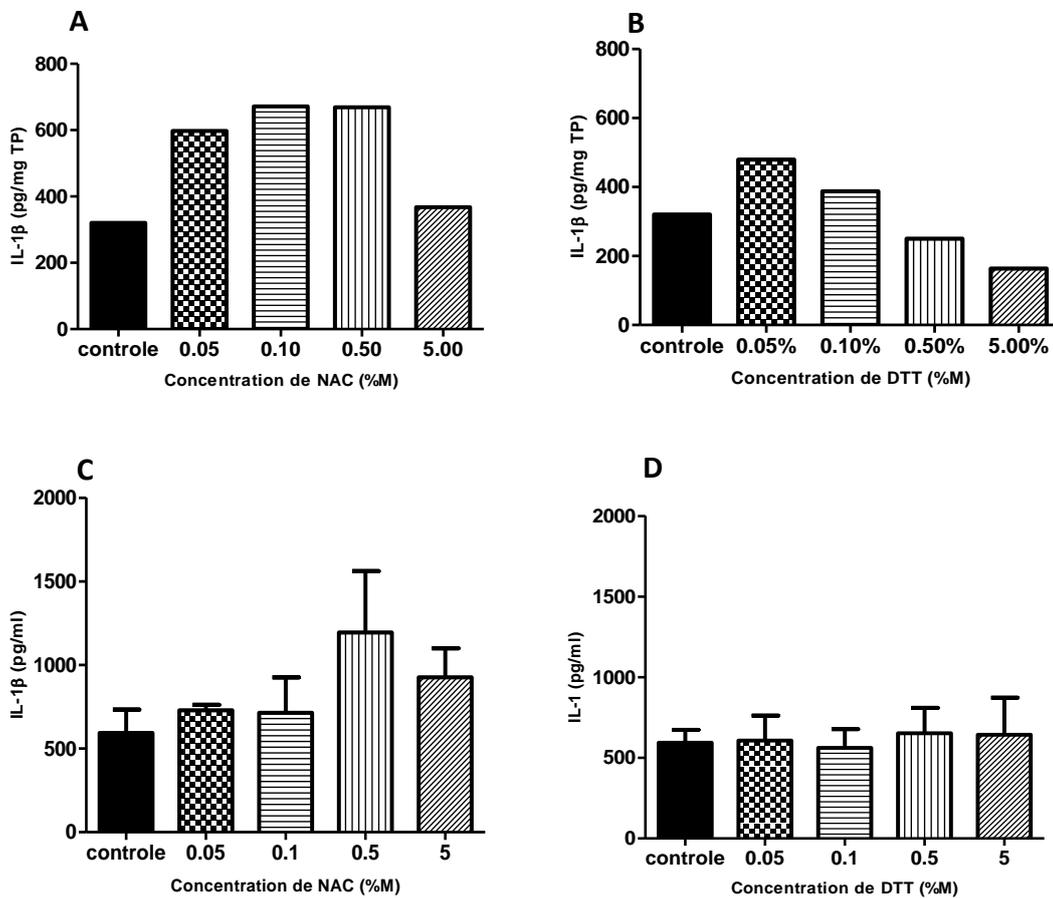


Figure 41 : Corrélation entre les concentrations de DTT / NAC ajouté au mucus collecte durant l'œstrus plus tard postpartum et la concentration détectable de l'IL-1 β en utilisant la technique ELISA. Les résultats sont interprétés par mg de protéine totale dans MCV (A et B) ou bien par ml de MVC (C et D). Dans C et D, les résultats sont présentés par la moyenne \pm

erreur-type de la moyenne (SEM). Les différences entre les protocoles et le contrôle n'étaient pas significatifs ($P > 0.05$).

En comparant la moyenne de la concentration d'IL-1 β dans le MCV collecté à différents stades postpartum, nous avons trouvé que la détectable concentration de l'IL-1 β était significativement plus importante dans le MCV collecté durant les deux premières semaines postpartum et traité sans aucun agent réducteur ou avec DTT, en comparant avec le MCV collecté durant l'œstrus (Cf. Figure 42). En utilisant NAC, la différence n'était pas importante dans le mucus collecté durant les deux périodes.

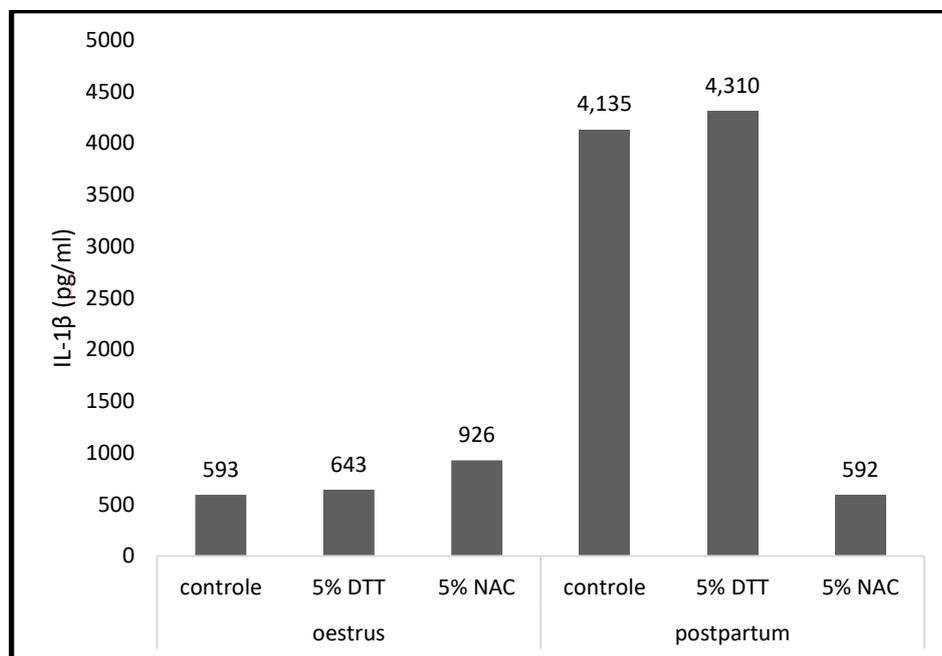


Figure 42: représentation graphique des résultats de détectable concentration d'IL-1 β dans le MCV collecté durant les deux premières semaines postpartum ou durant l'œstrus et traité par DTT, NAC ou sans agent réducteur.

4. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons premièrement testé si le mucus cervico-vaginal pourrait être utilisé pour le dosage des marqueurs de l'inflammation utérine. Et puis nous avons comparé l'effet de traitement de MCV avec ou sans un agent réducteur en vue d'optimiser une nouvelle technique d'analyse de la signature inflammatoire après le part. Finalement nous avons comparé les différents protocoles de traitement de MCV collectés dans les deux semaines suivant le part et plus tard durant l'œstrus chez des vaches saines et cyclique pour sélectionner le protocole adéquat à chaque période postpartum.

À l'exception de deux, toutes les vaches avaient plus de 50% de neutrophiles dans leurs MCV deux semaines après le part, ce qui est normal à cette période postpartum lorsque le système immunitaire est à son activité maximale pour assurer une involution utérine rapide et complète. Bien que l'utilisation de la cytologie cervicale pour le diagnostic des infections utérines soit toujours un sujet de débat, nous avons montré que la cytologie de MCV est une méthode facile, simple et non onéreuse.

Le DTT est un agent réducteur qu'il a été utilisé depuis longtemps pour décomposer les liaisons disulfures entre les résidus cystéines dans le mucus pour l'homogénéiser. Les protéines de mucus sont surtout représentées par les mucines qui sont longues, minces et flexibles chaînes, de type ver avec des régions glycosylées chargées négativement, inter-séparées par un peptide hydrophobe globulaire (perles) [268]. MCV collecté deux semaines après le part et mélangé à 1% mM DTT a donné une détectable concentration de la protéine totale plus que le mucus traité uniquement avec PBS. En revanche, le traitement de MCV d'une seule vache deux semaines après le part, avec différentes concentrations de DTT a démontré que DTT n'affecte pas la concentration détectable de la protéine totale sauf si la concentration de DTT dépasse 13.3% du volume final de mélange, soit 200 μ l de 1mM DTT ajouté à 1 ml de mucus, ou il n'était pas possible de détecter les protéines par la technique de BCA. Cela pourrait être due à la dégradation des protéines sous l'effet de la forte concentration de DTT.

En utilisant NAC pour le traitement de MCV, nous avons trouvé que le NAC n'affecte pas la concentration détectable de la protéine totale qu'avec une concentration supérieure ou égale à 20% du volume finale de mélange, soit un volume \geq 300 μ l de 1mM NAC ajoutés à 1 ml de MCV. Il a été démontré que les groupes réactifs sulfhydrile dans la N-acétylcystéine sont

mucolytiques et qu'ils agissent en décomposant la liaison disulfure dans les crachats [269]. De ce fait, plus la concentration de NAC ajoutée au MCV est élevée plus les protéines sont dégradées et moins sont détectables par la technique de BCA. C'est pour cette raison nous avons trouvé qu'à 20%, le NAC réduit dramatiquement la concentration détectable de la protéine totale.

La technique de séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires par la technique SDS-PAGE a confirmé que plus en augmentant la concentration de NAC ou DTT plus les bandes de protéines dans le MCV du postpartum et œstral sont moins denses notamment en ce qui concerne les protéines de plus de 100 KDa. Ce qui confirme l'effet réducteur de DTT et NAC sur les protéines de MCV. Pour le dosage des biomarqueurs de grands poids moléculaires tels que Hp, il est déconseillé de traiter le MCV avec une forte concentration de DTT ou NAC.

Souvent le méthanol est utilisé pour diluer le mucus avant faire le dosage des biomarqueurs de l'inflammation [173, 215, 216]. Dans la présente étude, nous avons trouvé que l'utilisation de méthanol n'affecte pas la concentration détectable de la protéine totale quelle que soit la concentration de l'agent réducteur utilisée pour traiter le MCV du postpartum ou œstral, ce qui montre que le méthanol n'a pas un effet bénéfique sur l'analyse des protéines dans le MCV.

Nous avons trouvé que les niveaux de l'IL-6 et IL-8 étaient plus élevés dans le MCV postpartum traité avec PBS, par rapport au MCV postpartum traités avec DTT. Cela peut être dû au fait que le DTT affecte la stabilité de cytokines dans le mucus ce qui diminue leur détection par la technique d'ELISA. Le traitement par la DTT réduit de manière significative la concentration détectable de nombreuses cytokines dans le crachat tel que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), LTB4 (Leucotriène B4) et MPO (Myélopéroxydase). A une concentration plus élevée, le DTT affecte même les standards d'IL-6, SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) et LTB4 [186]. Sur le plan systémique, la concentration de cytokines dans le sang est affectée par le statut inflammatoire de l'utérus, et les vaches avec endométrite ont une concentration plus élevée de plusieurs cytokines notamment IL-1 β , TNF- α , et IL-6, en comparaison avec les vaches saines [222]. Dans le MCV collecté durant l'œstrus sur des vaches cliniquement saines, nous avons trouvé que le DTT et NAC n'affectent pas la concentration détectable d'IL-1 β . Cela pourrait être dû au fait que durant l'œstrus le mucus vaginal est riche

en liquide et moins visqueux que le mucus postpartum et surtout contient plus faible concentration de protéine totale que le mucus postpartum. De plus, le taux d'IL-1 β était constamment faible dans tous les échantillons quel que soit le protocole utilisé pour traiter le MCV du fait que les vaches étaient cliniquement saines et cyclées. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons sélectionné au hasard une vache et nous avons procédé son MCV de la même manière que nous avons fait avec le mucus œstral et nous avons comparé le niveau d'IL-1 β entre les deux périodes. Nous avons trouvé que, le MCV collecté deux semaines après le part et traité avec PBS ou DTT donne des concentrations d'IL-1 β huit fois supérieures à celles trouvées dans le MCV collecté plus tard au postpartum durant l'œstrus. Le traitement de mucus avec NAC a donné des résultats très proches entre les deux périodes. De ce fait nous pensons que le protocole idéal pour le traitement de mucus vaginal varie en fonction de la période de collecte de mucus.

5. Conclusion

Le traitement du mucus sans aucun agent réducteur est le meilleur moyen de mesurer les cytokines / chimiokines dans le mucus collecté après le part, pour éviter toute interaction entre l'agent réducteur et la capacité de détecter la cytokine / chimiokine par la technique d'ELISA et donc de détecter les vaches qui développeront une maladie et les traiteront le plus rapidement possible. Cependant, il est préférable de traiter le mucus d'œstrus avec 0,5% de NAC pour mesurer les cytokines afin de déterminer le profil inflammatoire de la vache, en particulier dans le cas de l'infertilité. La DTT n'a aucun effet sur la mesure de cytokines dans le mucus d'œstrus, mais elle diminue de manière significative la concentration détectable de cytokines et de chimiokines dans le mucus postpartum précoce.

CHAPITRE 5 : DÉPISTAGE IMMUNOLOGIQUE DES ENDOMETRITES CLINIQUES

1. Introduction

Les incidences globales de la maladie utérine chez les bovins sont estimées à environ 75% [3, 4, 223], avec des incidences particulièrement élevées rapportées chez les vaches à haute production laitière [270]. L'infection et l'inflammation utérine du postpartum compromettent la fertilité en allongent l'intervalle vêlage-vêlage, augmentant ainsi le nombre de services par conception et en réduisant les taux de vêlage [7-9]. Les vaches laitières atteintes d'endométrite passent moins de temps au pic de lactation et nécessitent des traitements réputés entraînant des pertes économiques importantes [7, 10, 11]. Même après la résolution des signes cliniques de l'endométrite, la fécondité demeure inférieure à la normale [12]. Une mauvaise fertilité, une faible production laitière et le coût direct du traitement entraînent des pertes importantes pour l'industrie laitière [13].

L'activation normale de l'inflammation dans l'utérus commence avant le vêlage, en préparation à la parturition [37]. Cette inflammation -saine- physiologique est cruciale pour la délivrance, l'expulsion de liquides fœtaux, des lochies et des débris tissulaires. Elle régit également les événements importants du rétrécissement caronculaire et du remodelage du tissu endométrial pendant l'involution utérine. Lors d'une involution physiologique de l'utérus, une inflammation saine est caractérisée par une infiltration de leucocytes polymorphonucléaires et des niveaux élevés de cytokines inflammatoires et de protéines de la phase aiguë qui reviennent à des niveaux normaux après deux à trois semaines après vêlage [172]. Mais chez les animaux qui développent une endométrite, l'inflammation locale persiste longtemps après la clairance microbienne [213, 223]. Un défi majeur consiste à identifier les mécanismes moléculaires précis qui gèrent l'inflammation normale chez les animaux sains et ceux qui stimulent l'inflammation pathologique chez les vaches sensibles à l'endométrite clinique. L'identification précoce de ces principaux médiateurs inflammatoires permettrait aux agriculteurs et aux vétérinaires de prédire l'apparition de la maladie et d'administrer des schémas prophylactiques ou thérapeutiques appropriés.

L'endométrite clinique (EC) est définie comme une inflammation persistante de l'endomètre 21 jours postpartum (JPP) [14]. La stimulation excessive par un microbiome altéré

et / ou une sensibilité accrue par les molécules résultantes aux endommagements tissulaires générés localement (Damage-Associated Molecular Patterns : DAMPS) et aux molécules associées aux microbes (Microbe-Associated Molecular Patterns : MAMPS) sont susceptibles d'être responsables de la réponse inflammatoire locale altérée qui caractérise l'endométrite [171]. Auparavant, il a été reporté une augmentation de l'expression des gènes de l'immunité innée, dont IL-1, IL-6, IL-8, amyloïde sérique A (SAA) et l'haptoglobine (Hp) dans le tissu endométrial des vaches saines, 30 JPP [172, 223, 242]. Dans les vaches atteintes d'endométrites cytologiques, des niveaux encore plus élevés de nombreux de ces marqueurs inflammatoires ont été décrits dans le tissu utérin [171]. Le séquençage génétique de la nouvelle génération (next-generation sequencing) de biopsies utérines chez des vaches ayant une endométrite cytologique a confirmé l'expression accrue de nombreux gènes liés à l'inflammation chez les vaches saines et celles atteints d'endométrite. Curieusement, 7 JPP, des différences significatives dans les signatures de gènes ont été observées chez les animaux ayant endométrite cytologique par rapport aux animaux sains [171], ce qui suggère que le processus inflammatoire associé à l'endométrite pourrait être prédit dès sept jours après le vêlage.

La plupart des études antérieures sur l'activité inflammatoire postpartum dans l'utérus ont été réalisées sur le tissu utérin [223] ou le lavage utérin [210, 212, 213], qui ne peuvent être obtenus qu'à partir d'un nombre relativement faible d'animaux en raison du temps et des compétences techniques nécessaires. L'endométrite clinique (EC) est caractérisée une décharge vaginale purulente, mucopurulente ou fétide détectée soit par vaginoscopie, Metricheck ou une main gantée [26, 48, 53, 271]. Le mucus cervico-vaginal (MCV), peut être facilement recueilli à n'importe quel stade et ne nécessite pas de formation spécialisée, ce qui pourrait fournir une source plus accessible de matériel d'essai pour évaluer l'état inflammatoire de l'utérus. En plus de mucines et glucides, MVC contient des cytokines et d'autres molécules immunitaires innées [168, 169, 173]. Ici, nous émettons l'hypothèse que la signature inflammatoire de MCV reflète l'activité inflammatoire dans l'environnement endométrial et peut fournir une source utile de biomarqueurs pour EC dans les vaches laitières. Dans cet esprit, nous avons examiné MCV recueillies 7 et 21 JPP pour le dosage de marqueurs inflammatoires, y compris IL-1 β , IL-6, IL-8, SAA, Hp et C5b.

2. Matériel et méthodes

Des vaches laitières de race Prim-Holstein (n = 20) ont été incluses dans cette étude. L'historique clinique ; âge, parité et facilité de vêlage ont été enregistrés. MCV a été recueilli 7 JPP à l'aide d'une main gantée, et 21 JPP en utilisant le Metrichick. Le MCV collecté a été sujet d'une évaluation qualitative (couleur, consistance, odeur) et quantitative (volume) selon des critères définis précédemment [53]. Des frottis cytologiques ont été préparés et le mucus a été stocké dans des tubes de 20 ml et transporté dans une glacière au laboratoire pour traitement ultérieur.

Les échantillons ont été collectés sous la licence numéro (AE 19132 / P038) délivrée par l'autorité de réglementation des produits de santé en Irlande.

1.2 Collecte de MCV

Pour effectuer l'examen vaginal et la collecte de mucus, en utilisant des gants de vêlage, la queue a été levée et le périnée a été inspecté puis essuyé avec du papier sec, ou avec 70% éthanol si nécessaire pour éliminer les matières fécales et les grosses saletés. A 7 JPP, une main gantée a été insérée à travers la vulve dans le vagin et le mucus a été recueilli et transféré dans un tube à essai. A 21 JPP, MCV a été recueilli en utilisant Metrichick™ (Simcro Limited, Hamilton, Nouvelle-Zélande) selon le protocole proposé par Pleticha et al. [48]. Brièvement, le dispositif Metrichick et son gobelet de collecte ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70% et introduits doucement dans le vagin. Le Metrichick a ensuite été retiré et le MCV recueilli a été examiné et stocké dans des tubes stériles de 20 ml. Un nouveau gobelet de collecte a été utilisé pour chaque vache. Tous les MCV ont été évalués à l'aide d'une échelle de scores (0-3) précédemment décrite par Williams et al. [53] où le score 2 et 3 à 21 JPP indiquent une endométrite. Les échantillons de MCV ont été transportés au laboratoire dans une glacière, 4-6 heures après collecte.

1.3 Préparation de frottis cytologiques

A partir du MCV collecté, nous avons préparé des frottis cytologiques en double pour chaque vache (Sterlin Ltd, Thermo Fisher Scientific, UK). Les lames ont été séchées à l'air et colorées en utilisant le protocole de coloration Diff-Quick (Speed-Diff, Clin-Tech Limited,

Essex, Angleterre). Les frottis sont par la suite examinés sous microscope (grossissement x400) et le pourcentage de neutrophiles, macrophages, lymphocytes, basophiles, éosinophiles et cellules épithéliales ont été enregistrés.

1.4 Traitement du MCV

En laboratoire, le mucus a été préparé selon la technique décrite pour l'analyse du crachat humaine [186] et adaptée par Healy et al. [215] pour l'analyse du mucus vaginal bovin, avec de légères modifications. Le MCV est par la suite conservé à -80 °C pour une analyse ultérieure.

1.5 Dosage de la protéine totale

Le taux de protéine totale dans les échantillons de MCV a été déterminé en utilisant la technique de l'acide bicinchoninique (BCA Assay) (#23227, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc, UK) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les échantillons ont été décongelés et centrifugés à 3000 x g pendant 15 min à 4 °C et des aliquotes de 25 µl du surnageant ont été mesurées en double dans des plaques à 96 puits. Les plaques ELISA ont été incubées pendant 30 secondes sous agitation modérée puis incubées à 37 °C pendant 30 minutes. La densité optique de chaque puits a été mesurée en utilisant un protocole BCA préconfiguré sur le lecteur de microplaque. Les résultats ont été interprétés à l'aide du logiciel GraphPad® Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA).

1.6 Dosage de cytokines, protéines de la phase aigüe et le complément C5b dans le MCV

Les MCV congelés ont été décongelés et centrifugés à 3000 x g pendant 15 min à 4 °C et les surnageants ont été utilisés pour procéder la technique de ELISA. Nous avons mesuré les niveaux d'IL-1β, IL-6, IL-8, SAA, Hp et C5b (IL-1β : #ESS0027 et IL-6 : #ESS002 de Thermo Fisher Scientific Inc, UK ; SAA : #TP-802 PHASE™ Serum Amyloid A Assay (SAA) kit (Cf. Annexe XVII) et Hp : Tridelta PHASE™ Haptoglobin Assay kit, de Tridelta Development Ltd, Maynooth, Co. Kildare, Ireland (Cf. Annexe XVIII) et C5b : #MBS008530, MyBioSource, Inc, San Diego, CA 92195-3308, USA) (Cf. Annexe XIX). Les procédures ont été effectuées selon les directives

fournies par le fabricant, sauf pour l'IL-8 qui a été mesurée en utilisant un ELISA de sandwich optimisé par Cronin et al. [173]. Cette dernière s'est montrée plus sensible pour le dosage de l'IL-8 bovine que le kit ELISA pour IL-8 humain. Pour le dosage de l'IL-8 dans le MCV, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-IL-8 de souris anti-mouton comme anticorps de capture et l'IL-8 anti-mouton de lapin comme anticorps de détection (#MCA1660 et #AHP425, Bio-Rad Endeavour House, Langford Lane, Kidlington, OX5 1GE, UK) selon Cronin et al. [173]. La densité optique a été mesurée en utilisant un lecteur de spectrophotomètre à microplaques (GloMax®-Multi Detection System, Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711 USA). Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad® Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825, avenue Fay, bureau 230 La Jolla, CA 92037 USA).

1.7 Analyses statistiques

L'analyse statistique et l'interprétation graphique ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad® Prism 5. En supposant la non-normalité, les résultats entre les groupes ont été comparés avec le test de Mann-Whitney, et un test pairé de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les résultats au sein du groupe entre 7 et 21 JPP. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM) et ont été considérés comme statistiquement significatifs à la valeur $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Analyse MCV

L'examen clinique du MCV à 21 JPP a révélé que 10 vaches (50%) avaient EC et 10 (50%) étaient en bonne santé.

3.2. Cytologie du MCV

L'examen cytologique a révélé une abondance de polynucléaires neutrophiles (PNN), des macrophages et des cellules épithéliales de l'endomètre. Les basophiles et éosinophiles étaient absentes dans les MCV recueillis à 7 et 21 JPP (Cf. Figure 43). Le nombre de PNN était $>20\%$ chez la majorité des vaches ($n = 19$) à 7 JPP, sauf que chez deux vaches, le pourcentage de PNN était $<20\%$ à 21 JPP.

Dans les vaches atteintes d'EC, les pourcentages de PNN étaient plus élevés, alors que le pourcentage de cellules épithéliales était inférieur par rapport aux vaches saines à 21 JPP. ($P < 0,05$). Le niveau de PNN n'a pas changé significativement entre 7 et 21 JPP dans les deux groupes (Cf. Figure 43). Les taux de macrophages et de lymphocytes n'étaient pas différents entre les deux groupes à 7 et 21 JPP (Cf. Figure 43).

3.3. La protéine totale de MCV

Les taux de la protéine totale dans les MCV collectés 7 JPP étaient très variables ; entre 1, 015 et 14, 971 $\mu\text{g} / \text{ml}$ chez les vaches en bonne santé et entre 1, 095 et 12, 745 $\mu\text{g} / \text{ml}$ chez les vaches atteintes d'EC. Dans MCV recueilli 21 JPP, les niveaux de la protéine totale étaient entre 1, 237 et 13, 248 $\mu\text{g} / \text{ml}$ chez les vaches en santé et entre 1, 877 et 12, 685 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de vache à EC. Il est intéressant de noter que les taux de la protéine totale ont diminué de façon significative entre 7 et 21 JPP ($P < 0,01$) chez les vaches saines, mais sont demeurés pratiquement inchangés chez les vaches avec EC ($P = 0,16$) (Cf. Figure 44).

3.4. Biomarqueurs inflammatoires de MCV

Les taux de cytokines, chimiokines et protéines de phase aiguë ont été estimés par ml de MCV. Au cours des deux périodes de prélèvement, nous avons détecté des taux élevés d'IL-1 β , IL6, IL-8, SAA, Hp et C5b dans le MCV de tous les animaux des deux groupes. Les taux d'IL-6, d'IL8 et de Hp étaient plus élevés chez les vaches avec EC 21 JPP ($P < 0,01$) que chez les vaches saines, alors que ces différences n'étaient pas significatives 7 JPP. (Cf. Figure 45. B, C et 4. B). Cependant, les taux d'IL-1 β étaient significativement plus élevés tant 7 ($P < 0,05$) et 21 ($P < 0,001$) JPP chez les vaches ayant développé une endométrite que chez les sujets sains (Cf. Figure 45.A). En revanche, les taux de SAA ($P < 0,05$) et de C5b ($P < 0,01$) étaient plus élevés chez les vaches en bonne santé 21 JPP, comparativement aux vaches avec EC alors que les taux de SAA de 7 JPP étaient semblables dans les deux groupes (Cf. Figure 46 A et 5). Les taux de C5b étaient également plus élevés chez les vaches saines 21 JPP ($P < 0,01$), par rapport au groupe d'EC et étaient similaires dans les deux groupes 7 JPP (Cf. Figure 47). Les taux d'IL-6 dans le MCV ont diminué chez les vaches en bonne santé au cours du temps ($P < 0,05$), alors qu'ils ont resté élevé dans le groupe d'EC.

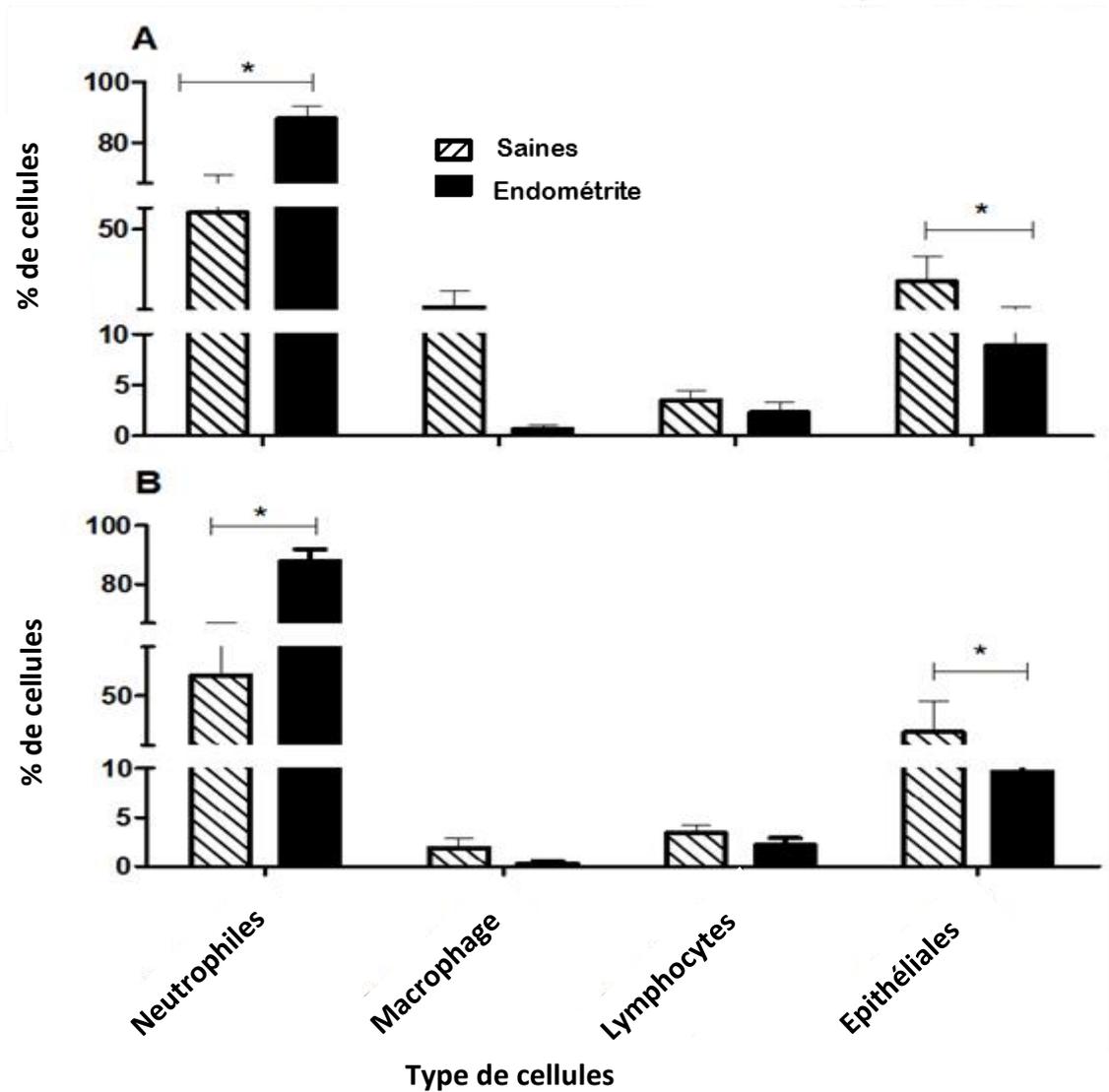
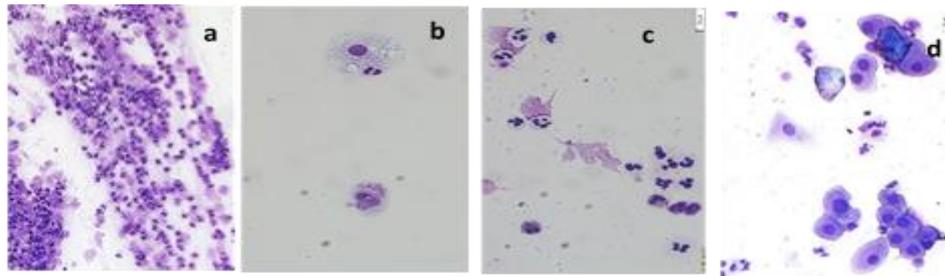


Figure 43 : les pourcentages de neutrophiles, macrophages, lymphocytes et cellules épithéliales ont été calculé dans le MCV collecté à 7 (A) et 21 (B) des vaches ultérieurement diagnostiquées comme atteintes d'endométrite clinique (EC ; n = 10) et saines (n = 10). *P < 0.05. Des images représentatives des frottis cytologiques de MCV de vaches saines montraient un taux élevé de neutrophiles (a) ; frottis montrant des macrophages (b), lymphocytes et neutrophiles (c), cellules épithéliales et neutrophiles (d).

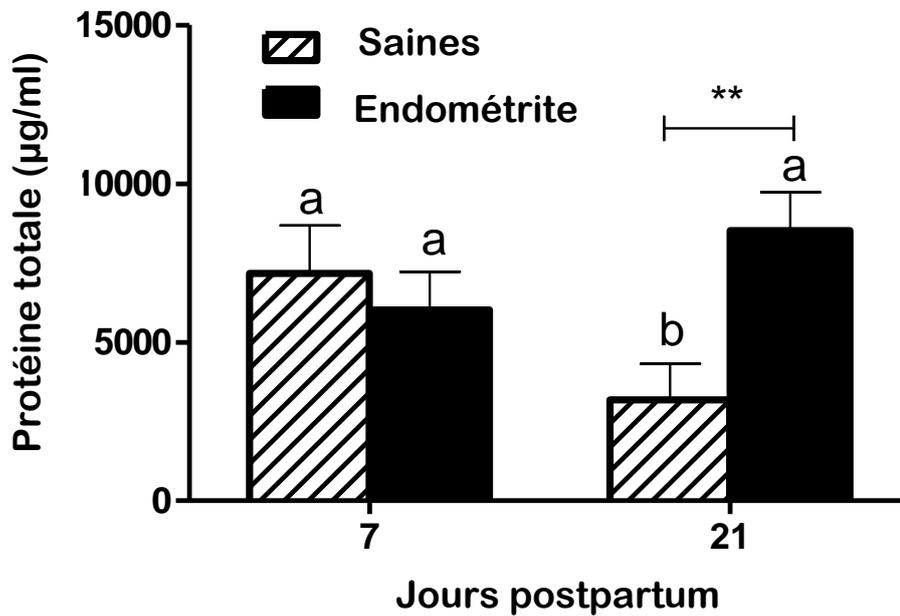


Figure 44: niveaux de la protéine totale dans les MCV collectés des vaches avec endométrites cliniques (n = 10) et des vaches saines (n = 10) à 7 et 21 JPP. Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM et les différences significatives entre les groupes sont calculées $a^{**}P < 0.01$. a, b différences significatives entre les résultats de MCV collectés aux moments différents dans les deux groupes avec une probabilité, $P < 0.01$.

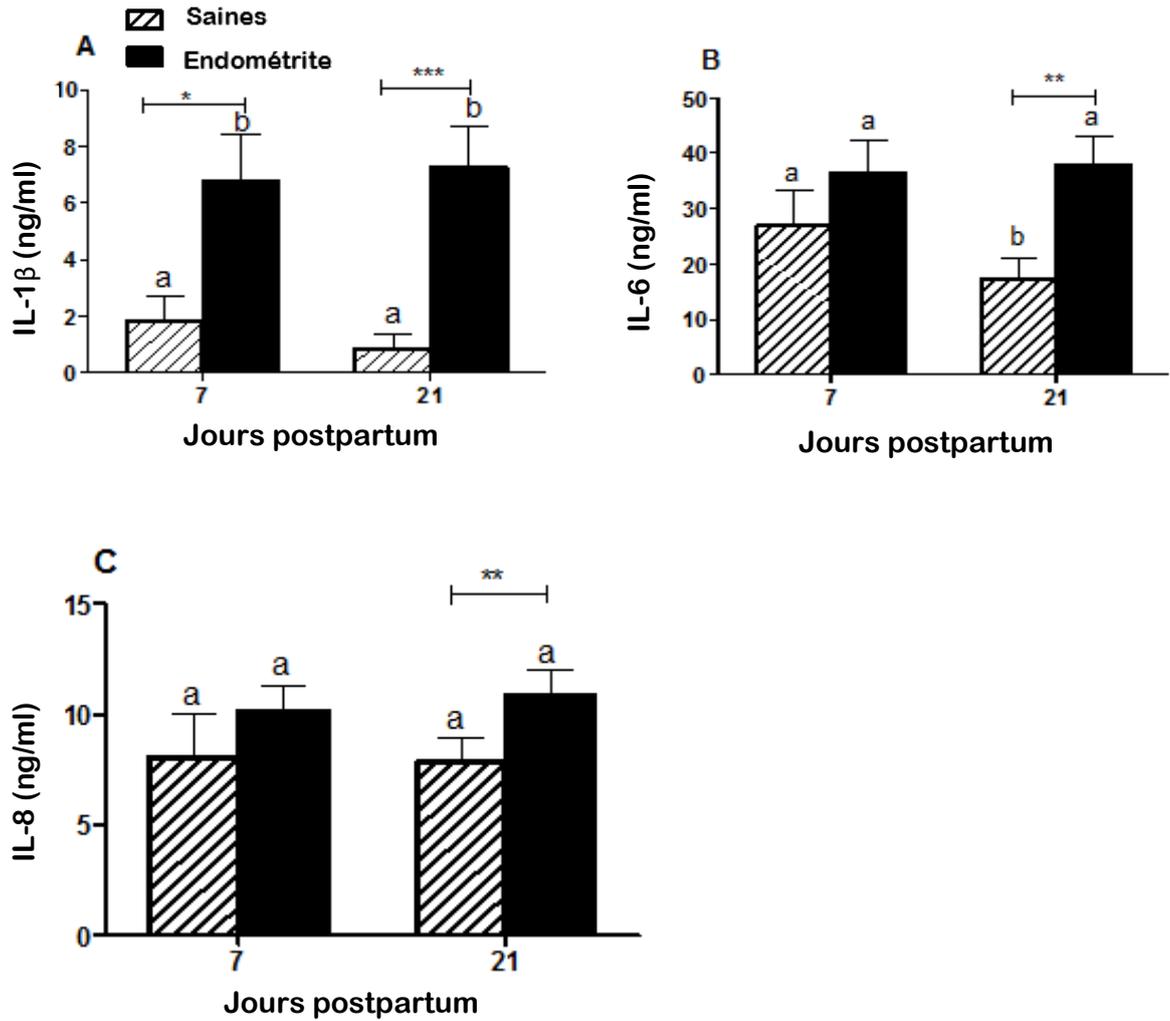


Figure 45: IL-1 β , IL-6 et IL-8 ont été mesurées dans les MCV collectés à 7 et 21 JPP chez les vaches avec EC (n=10) et vaches saines (n=10). Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM et les différences significatives entre les groupes sont calculées a ***P < 0.001, **P < 0.01 et *P < 0.05. ^{a,b} Différences significatives entre les résultats de MCV collectés aux moments différents dans les deux groupes avec une probabilité, P < 0.05.

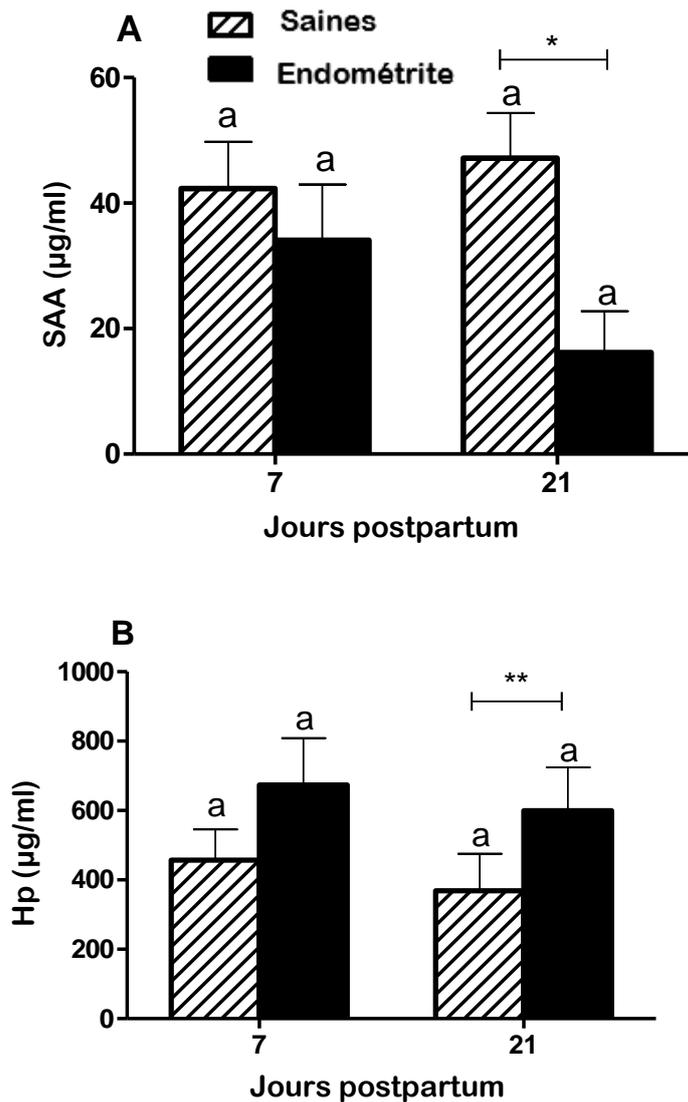


Figure 46: SAA et Hp ont été mesurées dans les MCV collectés à 7 et 21 JPP chez les vaches avec EC (n=10) et vaches saines (n=10). Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM et les différences significatives entre les groupes sont calculées a $**P < 0.01$ et $*P < 0.05$. ^{a,b} Différences significatives entre les résultats de MCV collectés aux moments différents dans les deux groupes avec une probabilité, $P < 0.05$.

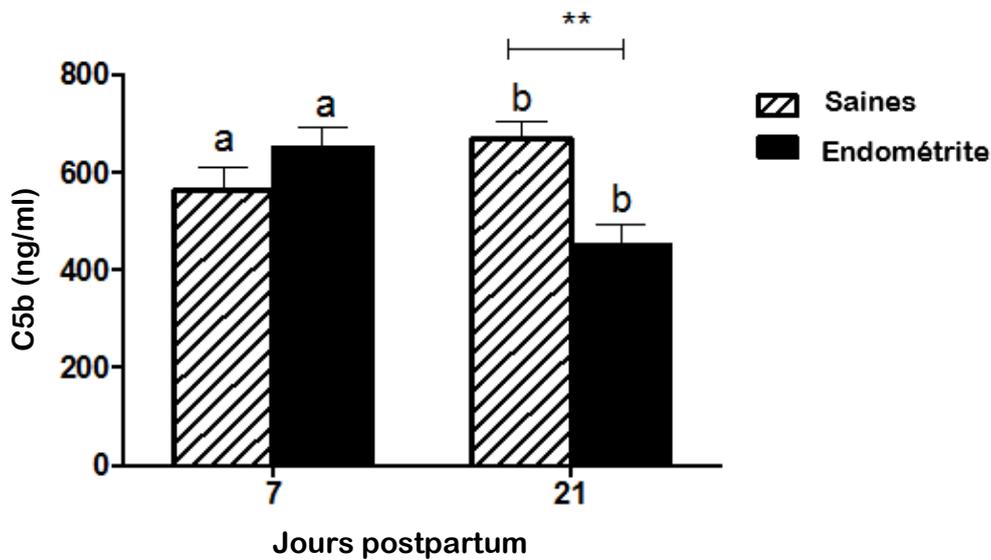


Figure 47: C5b a été mesuré dans les MCV collectés à 7 et 21 JPP chez les vaches avec EC (n=10) et vaches saines (n=10). Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM et les différences significatives entre les groupes sont calculées a $**P < 0.01$. a, b Différences significatives entre les résultats de MCV collectés aux moments différents dans les deux groupes avec une probabilité, $P < 0.05$.

4. Discussion

L'endométrite chez la vache laitière continue d'être un problème majeur de bien-être et animal avec une perte financière du secteur laitier mondial. L'inflammation associée à l'infection utérine n'a pas seulement un impact sur les fonctions de reproductions en retardant l'involution utérine et la reprise de l'activité ovarienne, mais aussi une réduction de la production laitière, en particulier au début de lactation [11, 50, 53, 160]. Il a été déjà montré que les différences dans les niveaux de l'expression endométriale des gènes inflammatoires peuvent différencier entre les vaches en bonne santé et celles qui vont développer une endométrite [171, 223]. Dans la présente étude, nous montrons que le MCV est convenable pour la visualisation des changements associés à l'inflammation utérine, au niveau moléculaires des médiateurs de l'inflammation et cellulaires durant la période postpartum.

Parmi le grand nombre de cellules détectables dans les MCV 7 et 21 JPP, les PNN et les cellules épithéliales de l'endomètre étaient les cellules les plus abondantes aux deux moments. Les pourcentages de PNN étaient plus élevés dans les vaches avec EC à 21 JPP,

comparativement aux vaches saines, alors que ces dernières avaient un nombre plus élevé de cellules épithéliales 21 JPP.

Il y avait des niveaux élevés de protéines dans tous les échantillons de MCV. Les taux de la protéine totale ont diminué entre 7 et 21 JPP chez les vaches en bonne santé, alors qu'elles sont demeurées constamment élevées au cours du temps chez les vaches à EC. Ainsi, les niveaux élevés de protéines dans le mucus représentent un marqueur potentiel pour le diagnostic de l'inflammation chronique sous forme d'endométrite. Des concentrations élevées de cytokines (IL-1 β et IL-6), chimiokine (IL-8), protéines de phase aiguë (SAA et Hp) et la protéine du système de complément C5b peuvent également être dosées dans le MCV collecté 7 et 21 JPP de tous les animaux. Des études antérieures ont révélé des niveaux inférieurs d'IL-6, SAA et Hp dans le mucus collecté par un lavage utérin [212]. La collecte de sécrétions utérines par cette méthode nécessite une perfusion de solution dans l'utérus, contribuant ainsi à un facteur de dilution inconnu. Le dosage de molécules spécifiques dans les lavages utérins peut donc sous-estimer le niveau réel de biomarqueurs. De plus, il est impossible de récupérer la totalité de volume de solution infusée [58, 166]. En revanche, des concentrations plus élevées de cytokines et d'autres biomarqueurs inflammatoires ont été mesurés avec succès dans le MCV [210, 213, 215, 217], ce qui suggère que le MCV peut fournir un échantillon plus fiable pour le dosage de marqueurs inflammatoires spécifiques de l'utérus.

En utilisant le MCV recueilli auprès des vaches avec EC et vaches saines à 7 et 21 JPP, nous avons constaté des changements significatifs dans les niveaux des molécules de l'immunité innée entre les deux groupes à 7 et 21 JPP. Les taux d'IL-1 β , IL-6, IL8 et Hp, mais pas de SAA et C5b, étaient constamment plus élevés dans le MCV provenant de vaches avec EC 21 JPP, ce qui montre que la réaction inflammatoire dans l'endomètre est maintenue chez les vaches qui vont développer une endométrite. Les taux d'IL-6 étaient systématiquement élevés chez les vaches en bonne santé et dans les vaches atteintes d'EC 7 JPP. Des résultats similaires ont été rapportés dans le MCV chez des vaches souffrant de dystocie [215, 216], qui est considérée comme un facteur de risque commun pour l'endométrite clinique et subclinique [104]. Ici, les taux d'IL-6 étaient plus élevés dans le MCV des vaches avec EC 21 JPP, comparativement aux animaux sains ($P < 0,01$). Auparavant, il été trouvé que l'expression du gène de l'IL-6 était régulée positivement chez les vaches ayant une endométrite cytologique 21 JPP, mais les taux d'expression génique étaient similaires 7 JPP [171]. De

même, Brodzki et al. [212] ont rapporté des niveaux similaires d'IL-6 dans les lavages utérins de vaches souffrant d'endométrite subclinique et des vaches en bonne santé 5 JPP. Intéressamment, nous avons constaté que les vaches saines avaient augmenté les niveaux d'IL-6 7 JPP par rapport à 21 JPP ($P < 0,05$). Au cours de l'inflammation utérine précoce, les cellules épithéliales de l'endomètre produisent IL-6 [216] qui stimule la production de protéines de la phase aiguë, ainsi que le recrutement de neutrophiles [272]. Tous ces facteurs contribuent à la réaction inflammatoire de l'endomètre, nécessaire à l'involution utérine normale [172].

L'IL-1 est considérée comme une puissante cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'activation immunitaire dans le postpartum [215]. Les taux d'IL1 β étaient plus de trois fois plus élevés chez les vaches ayant une EC que chez les vaches en bonne santé 21 JPP. De manière plus intéressante, les taux d'IL1 β étaient significativement plus élevés entre les groupes 7 JPP, ce qui indique que l'expression élevée de ce marqueur inflammatoire est un événement clé pour la réaction inflammatoire précoce. L'augmentation précoce de l'expression et la sécrétion de l'IL1 β augmenterait et amplifierait l'activation en aval d'autres médiateurs inflammatoires et le développement subséquent d'une maladie inflammatoire de l'utérus. Il a été déjà découvert que l'expression du gène de l'IL-1 β était significativement augmentée à 7 JPP dans le tissu utérin des vaches qui développaient par la suite une endométrite cytologique et cette élévation était persistante 21 JPP comparativement aux vaches en bonne santé [171], ce qui suggère que les taux de cytokines dans le MCV donnent une réflexion précise de niveaux d'expression des gènes dans le tissu endométrial. Alors que les taux d'IL-1 β dans le groupe d'EC restent élevés au cours de la période d'essai, ils sont constamment faibles chez les animaux sains, et on pense qu'ils le restent jusqu'à huit semaines après vêlage [213].

Les niveaux de l'IL-8 dans le MCV étaient similaires à 7 JPP dans les deux groupes, mais à 21 JPP, ils étaient plus élevés chez les vaches avec EC. De même, Healy et al. [215, 216] ont rapporté que les taux d'IL-8 dans le mucus vaginal étaient similaires chez les vaches avec dystocie et les vaches avec un vêlage normal une semaine après le part, mais les vaches avec dystocie avaient un taux plus élevé d'IL-8 trois semaines après vêlage.

Les protéines de la phase aiguë, les taux de SAA et Hp dans les MCV n'ont pas changé de façon significative au cours du temps chez tous les animaux. Cependant, les concentrations de Hp 21 JPP étaient plus élevées chez les vaches avec CE. En revanche, les taux de SAA étaient

plus élevés chez les vaches saines 21 JPP ($P < 0,05$). SAA induit la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [273], inhibant ainsi plusieurs mécanismes inflammatoires, y compris le l'éclatement oxydative (Oxidative Burst) de l'activité phagocytaire [206, 274]. L'augmentation de la sécrétion de la SAA dans le MCV chez les vaches en bonne santé après le part peut donc être importante pour moduler l'inflammation physiologique et prévenir les lésions tissulaires causées par une inflammation persistante et sévère. Les taux de système de complément C5b étaient également plus élevés chez les vaches saines 21 JPP, ce qui confirme indirectement notre constatation antérieure concernant l'augmentation de l'expression de C5AR1, un récepteur de C5a, 21 JPP chez des vaches en bonne santé [171]. L'activité phagocytaire des neutrophiles s'est avérée compromise au début du postpartum, en particulier chez les vaches souffrant d'infection utérine [179, 217]. La lyse des agents pathogènes par C5b représente une alternative importante pour renforcer l'activité du système immunitaire et accélère l'involution utérine et module l'inflammation locale.

Alors que la sécrétion accrue de nombreuses cytokines 21 JPP est un indicateur de l'endométrite clinique, SAA et C5b sont augmentées dans les vaches saines 21 JPP. Ces molécules peuvent donc jouer un rôle important dans le contrôle de l'inflammation ou la promotion du remodelage tissulaire. Ainsi, l'augmentation de l'expression de SAA et de C5b au début du postpartum pourrait moduler l'inflammation et prévenir l'endométrite, et le dosage d'IL-1 β 7 JPP peut représenter un biomarqueur clé pour la détection de l'EC à un stade précoce.

5. Conclusion

Cette étude montre que les cytokines, chimiokines, protéines de la phase aiguë et les composants du système complément peuvent être analysés avec succès dans le MCV des vaches avec EC durant le postpartum. Leur dosage dans les échantillons prélevés 7 et 21 JPP peut être utilisé pour surveiller la réaction inflammatoire dans l'utérus. Bien que les taux élevés d'IL-1 β 7 JPP sont caractéristiques d'une évolution inflammatoire pathologique à l'origine de l'endométrite clinique à un stade ultérieur, SAA et C5b peuvent moduler l'inflammation physiologique et prévenir l'endométrite.

Conclusion générale

A travers la présente étude expérimentale il était clair que le diagnostic des endométrites à l'aide d'une main gantée, la technique diagnostique de routine dans les élevages Algériens ne permet de détecter que la forme clinique de l'endométrite. En revanche, la cytologie utérine représente une bonne technique de diagnostic qui permet de mettre en évidence l'endométrite clinique et subclinique tout en restant une technique simple, pratique et reproductible. Bien que la biopsie utérine soit toujours à débattre, elle donne des bons résultats qui sont même proches à ceux de la cytologie utérine.

Nous avons étudié le taux des endometritis chez 99 vaches laitière entre 21-60 JPP en utilisant trois méthodes de diagnostic à savoir l'examen clinique du contenu vaginal, la cytologie et la biopsie utérines. Pour la cytologie utérine, nous avons trouvé qu'à partir de 9% de polynucléaires neutrophiles (PNN), le taux de gestation est significativement affecté, et ce seuil de PNN est adopté pour classer les vaches comme affectées ou indemnes d'endométrites. Nous avons constaté que l'endométrite touche presque la moitié (41.4%) du cheptel étudié. Parmi ces vaches, 22.2% sont détectables par un examen clinique alors que les autres (19.2%) passent inaperçues pour l'éleveur et même pour le vétérinaire.

En comparant la cytologie utérine avec l'examen de routine de la décharge vaginale, nous avons trouvé que cette dernière donne une sensibilité et spécificité de 54% et 90%, respectivement. En plus, 31.2% des vaches avec une décharge vaginale positive avaient une cytologie utérine négative. La biopsie utérine avait une sensibilité et spécificité de 73% et 86%, en comparaison avec la cytologie utérine. De plus 27.3% des vaches qui avaient une décharge vaginale positive avaient une biopsie utérine négative.

Cette forte prévalence des endométrites a gravement affecté les performances de la reproduction chez la vache en retardant la reprise de l'activité ovarienne et en augmentant le nombre d'insémination pour avoir une gestation, ce qui réduit le taux de gestation et alourdit la facture de la gestation de l'élevage laitier.

La rétention placentaire, la mammites, le sexe male du veau, l'hypocalcémie et la race de la vache affectent la prévalence de l'endométrites cytologique. Les facteurs de risque de l'endométrite clinique étaient la rétention placentaire, la métrite et la mortinatalité. Pour la forme subclinique, les facteurs de risque étaient l'hypocalcémie, l'assistance de vêlage et le

sexe male du veau. Ces informations sont très précieuses car elles donnent une image détaillée sur la gestion correcte de l'élevage pour la bonne maîtrise de la reproduction. En déterminant les facteurs de risque dans une ferme donnée, nous pouvons estimer la prévalence de l'endométrite, sans faire le diagnostic individuel pour chaque vache.

L'endométrite clinique allonge l'intervalle entre le vêlage et la 1^{ère} insémination et l'insémination fécondante de respectivement 19 et 37 jours et diminue les chances de réussite à la première insémination et la gestation à 150 JPP par 65.7% et 44.2%, respectivement par rapport aux vaches indemnes. De même, nous avons trouvé que l'endométrite subclinique prolonge l'intervalle vêlage–1^{ère} insémination et vêlage- insémination fécondante par 24.2 et 48 jours, respectivement tout en diminuant le taux gestation à 150 JPP par 58 jours. Nous n'avons enregistré aucun cas de réussite à 1^{ère} insémination chez les vaches atteintes d'endométrites subcliniques, contre 79.3% pour les vaches indemnes.

Dû à l'impact économique sévère des endométrites, un diagnostic précoce est devenu une priorité. Nous proposons que l'inflammation de l'endomètre est reflétée dans le mucus cervico-vaginal (MCV) qui pourrait donc être utilisé comme outil de pronostic. Le MCV a été recueilli auprès de 20 vaches laitières (10 avec endométrite clinique et 10 indemnes) 7 et 21 JPP. Les cellules polymorphonucléaires (PMN), les leucocytes mononucléaires et les cellules épithéliales ont été comptées, le niveau de protéines totales a été calculé et les niveaux de l'interleukine 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, l'Amyloïde Sérique A (SAA), l'Haptoglobine (Hp) et le C5b (partie du système de complément) ont été analysés par ELISA dans le MCV.

Les PMN étaient toujours élevés dans les MCV de 7 et 21 JPP, mais étaient plus élevés dans les MCV des vaches avec une endométrite clinique 21 JPP par rapport aux vaches saines. En revanche, il y avait plus de cellules épithéliales dans les vaches saines 21 JPP que chez les vaches avec endométrite cliniques. Les niveaux de protéines totales ont diminué de manière significative dans le MCV chez les vaches saines entre les jours 7 et 21 postpartum.

Tous les biomarqueurs inflammatoires, à l'exception du C5b, sont demeurés élevés chez les vaches souffrant d'endométrite clinique de 7 à 21 JPP, ce qui indique une inflammation endométriale persistante et chronique. Les taux d'IL1 β , IL-6, IL-8 et de Hp étaient plus élevés dans les MCV chez les vaches souffrant d'endométrite clinique par rapport aux vaches saines 21 JPP. Il était très intéressant de constater que les taux d'IL-1 β sont augmentés dans le MCV des vaches avec endométrite clinique mais pas chez les vaches saines 7 JPP, suggérant que le

dosage précoce d'IL-1 β pourrait constituer un marqueur prédictif utile de l'endométrite clinique. Nos résultats montrent que le MCV est très pratique pour le dépistage des marqueurs de l'inflammation qui témoigne une inflammation persistante de l'utérus. En revanche, les niveaux de SAA et C5b ont été augmentés chez les vaches saines 21 JPP, par rapport aux vaches souffrant d'endométrite clinique, suggérant que ces protéines de la phase aiguë pourraient avoir un rôle anti-inflammatoire.

Recommandation

L'endométrite est sans doute une maladie dangereuse et coûteuse et nécessite une prise en charge particulière de la part de différents actionnaires de la santé vétérinaire.

Pour les vétérinaires : il est recommandé de faire examen de l'état générale de la vache après vêlage pour la détection de différentes pathologies métaboliques et fonctionnelles qui peuvent affecter le bon fonctionnement de l'organisme et favorisent le développement d'une endométrite. L'élaboration d'une liste pour les principaux facteurs de risque spécifiques à l'élevage en question est nécessaire pour le diagnostic en masse. Dans un délai de 10 jours après le part, on recommande de faire un examen clinique de l'appareil génital pour la détection d'éventuelles lésions ou blessures associées au vêlage. Toutes vaches avec une décharge vaginale fortement purulente avec une odeur nauséabonde nécessitent un traitement d'urgence. Après 21 JPP, une cytologie utérine est nécessaire pour la détection de la forme subclinique. A cette occasion, un examen rectal de l'état de l'involution utérine avec l'évaluation du degré d'ouverture du col offrent des informations précieuses sur la qualité de l'activité immunitaire chez la vache.

Pour le personnel du laboratoire, il est recommandé qu'il collabore avec les vétérinaires du terrain pour leur faciliter la tâche par l'interprétation des lames de la cytologie utérine et en cas de nécessité, la réalisation et l'interprétation des coupes de biopsies utérines. L'acquisition d'un matériel de pointe, tels que PCR, automate ELISA, microscope avec camera de haute résolution et automate de l'analyse sanguin est nécessaire pour le développement des capacités de diagnostic des services compétents et pour la bonne gestion et prise en charge des infections utérines.

Bien que la technique de diagnostic que nous avons développée est encore au début de son évolution. Elle a bien prouvé qu'elle est facile, non invasive et donne d'excellentes résultats pour le dépistage des vaches à risque de développer une endométrite. Pour le moment, elle reste valable comme technique de recherche, mais pour une utilisation de routine par les vétérinaires, elle nécessite une adoption par les firmes qui développent les techniques de diagnostics pour la reproduire avec moindre coût et plus de simplicité.

Références

- [1] Martinez J, Thibier M. Reproductive disorders in dairy cattle: I. Respective influence of herds, seasons, milk yield and parity. *Theriogenology*. 1984;21:569-81.
- [2] Markusfeld O. Factors responsible for post parturient metritis in dairy cattle. *Vet Rec*. 1984;114:539-42.
- [3] Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 2005;64:1879-88.
- [4] Foldi J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, et al. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2006;96:265-81.
- [5] More SJ, McKenzie K, O'Flaherty J, Doherty ML, Cromie AR, Magan MJ. Setting priorities for non-regulatory animal health in Ireland: results from an expert Policy Delphi study and a farmer priority identification survey. *Prev Vet Med*. 2010;95:198-207.
- [6] Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin H, Kutzner P, et al. Evaluation of systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2001;84:2010-7.
- [7] LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2002;85:2223-36.
- [8] Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*. 2010;74:1271-8.
- [9] Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*. 2000;53:1729-59.
- [10] Kinsel ML. 29th Dairy cow postpartum disease: Definition and dilemma. Annual Convention of American Association of Bovine Practitioners (AABP). 29 ed. San Diego, CA. AABP, Auburn, AL1996. p. 3-7
- [11] Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, Leblanc SJ. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2011;94:1339-46.
- [12] Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J*. 2008;176:115-21.
- [13] Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Mohanty TK, Sejian V, Kumar N, et al. Potential of acute phase proteins as predictor of postpartum uterine infections during transition period and its regulatory mechanism in dairy cattle. *Veterinary world*. 2016;9:91-100.
- [14] Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 2006;65:1516-30.
- [15] Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97:195-201.
- [16] LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*. 2008;176:102-14.
- [17] Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM, Gilbert RO. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*. 2011;94:762-70.
- [18] Lee JI, Kim IH. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*. 2007;8:283-8.
- [19] Kim I-H, Kang H-G. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *The Journal of reproduction and development*. 2003;49:485-91.

- [20] Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*. 2010;74:127-34.
- [21] Vergara CF, Dopfer D, Cook NB, Nordlund KV, McArt JA, Nydam DV, et al. Risk factors for postpartum problems in dairy cows: explanatory and predictive modeling. *J Dairy Sci*. 2014;97:4127-40.
- [22] Santos JE, Rutigliano HM, Sa Filho MF. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2009;110:207-21.
- [23] Ghavi Hosseini-Zadeh N, Ardalan M. Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. *Vet Res Commun*. 2011;35:345-54.
- [24] Bacha B, Regassa FG. 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*. 2010;42:397-403.
- [25] LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2006;89:1267-79.
- [26] Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*. 2009;81:1025-32.
- [27] Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*. 1999;77 Suppl 2:101-10.
- [28] Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2010;93:5225-33.
- [29] Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*. 1991;55:168-73.
- [30] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft aN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2002;123:837-45.
- [31] Elkjaer K, Ancker ML, Gustafsson H, Friggens NC, Waldmann A, Molbak L, et al. Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows determined using DNA-based fingerprinting: correlation to uterine condition and calving management. *Anim Reprod Sci*. 2013;138:39-48.
- [32] Wagener K, Grunert T, Prunner I, Ehling-Schulz M, Drillich M. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in postpartum dairy cows and their association with clinical endometritis. *Vet J*. 2014;202:527-32.
- [33] Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*. 2014;82:857-65.
- [34] Prunner I, Pothmann H, Wagener K, Giuliadori M, Huber J, Ehling-Schulz M, et al. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2014;82:1316-22.
- [35] Carneiro LC, Cronin JG, Sheldon IM. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reprod Biol*. 2016;16:1-7.
- [36] Jeremejeva J, Orro T, Valdman M, Kask K. Bacteriological and cytological findings during the late puerperal period after two different treatments of retained placenta followed by acute puerperal metritis. *Acta Vet Scand*. 2010;52:41.

- [37] Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J Dairy Sci.* 2009;92:621-5.
- [38] Santos TM, Bicalho RC. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One.* 2012;7:e53048.
- [39] Bencharif D, Tainturier D. Les métrites chroniques chez les bovins. *Point vét.* 2005;36:72-7.
- [40] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 2004;62:9-23.
- [41] Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 2008;69:714-23.
- [42] Deguillaume L. L'inflammation génitale post-partum de la vache. Paris: Pris Tech; 2010.
- [43] Troitzky K. Enquête sur les méthodes de diagnostic et de traitement des endométrites chez la vache en France: Ecole vétérinaire d'Alfort. France; 2010.
- [44] Mejia ME, Lacau-Mengido IM. Endometritis treatment with a PGF2alpha analog does not improve reproductive performance in a large dairy herd in Argentina. *Theriogenology.* 2005;63:1266-76.
- [45] Coche B, COUSTUMIER JL, ZUNDEL E. L'involution utérine. *Bull GTV.* 1987:43-67.
- [46] Bonafos LD, Kot K, Ginther OJ. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology.* 1995;43:713-21.
- [47] Deguillaume L, Chastant-Maillard S. Comment bien diagnostiquer les endométrites de la vache ? *Bulletin des GTV.* 2009;49:101-5.
- [48] Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. Evaluation of the Metricheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009;92:5429-35.
- [49] Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci.* 1997;80:984-94.
- [50] Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2009;44 Suppl 3:1-9.
- [51] Mee JF. The role of the veterinarian in bovine fertility management on modern dairy farms. *Theriogenology.* 2007;68 Suppl 1:S257-65.
- [52] Deguillaume L. Etude comparative des différentes techniques de diagnostic des métrites chroniques chez la vache: école vétérinaire d'Alfort. France 2007.
- [53] Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* 2005;63:102-17.
- [54] McDougall S, Macaulay R, Compton C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 2007;99:9-23.
- [55] Heuwieser W, Tenhagen BA, Tischer M, Luhr J, Blum H. Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. *Vet Rec.* 2000;146:338-41.
- [56] Gobikrushanth M, Salehi R, Ambrose DJ, Colazo MG. Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle. *Theriogenology.* 2016;86:1842-9.
- [57] Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci.* 2010;122:52-7.

- [58] Machado VS, Knauer WA, Bicalho ML, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. *J Dairy Sci.* 2012;95:1349-57.
- [59] Meira EB, Jr., Henriques LC, Sa LR, Gregory L. Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci.* 2012;95:6969-73.
- [60] Elliott L, McMahon KJ, Gier HT, Marion GB. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am J Vet Res.* 1968;29:77-81.
- [61] Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, Silva JR. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2002;37:31-5.
- [62] Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology.* 2011;75:1567-81.
- [63] Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology.* 2011;75:1311-8.
- [64] Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172:241-62.
- [65] Doig PA, McKnight JD, Miller RB. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can Vet J.* 1981;22:72-6.
- [66] Schlafer DH. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology.* 2007;68:413-22.
- [67] Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MH. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology.* 2012;78:495-501.
- [68] Overbeck W, Jager K, Schoon HA, Witte TS. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus-an in vitro study. *Theriogenology.* 2013;79:1262-8.
- [69] Bonnett BN, Miller RB, Etherington WG, Martin SW, Johnson WH. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire.* 1991;55:155-61.
- [70] Bonnett BN, Miller RB, Martin SW, Etherington WG, Buckrell BC. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire.* 1991;55:162-7.
- [71] Katagiri S, Takahashi Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology.* 2004;62:103-12.
- [72] Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, et al. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology.* 2010;73:988-94.
- [73] Loyi T, Kumar H, Nandi S, Mathapati BS, Patra MK, Pattnaik B. Differential expression of pro-inflammatory cytokines in endometrial tissue of buffaloes with clinical and sub-clinical endometritis. *Res Vet Sci.* 2013;94:336-40.
- [74] Van Camp SD. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4:229-45.
- [75] Tennant B, Peddicord RG. The influence of delayed uterine involution and endometritis on bovine fertility. *Cornell Vet.* 1968;58:185-92.

- [76] Ginther OJ. Reproductive biology of the mare. Basics and applied aspects: Equi Services; 1993.
- [77] Debois C, Manspeaker J. Endometrial Biopsy of the Bovine. In: edition, editor. Current therapy in theriogenology. Philadelphia ; Toronto:: Saunders; 1986. p. 1143
- [78] Bonnett BN, Wayne Martin S, Meek AH. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev Vet Med.* 1993;15:205-20.
- [79] Studer E, Morrow D. Uterine cultures and histological evaluation as complements to routine postpartum examinations. In: MA M, editor. Current therapy in theriogenology : diagnostic, treatment and prevention of reproduction diseases in animals. Philadelphia: WB Saunders Compagny; 1980. p. 223-6.
- [80] Kenney R, Doig P. Equine endometrial biopsy. *Therapy in Theriogenology* Philadelphia: DA Morrow and WB Saunders; 1986. p. 723–9
- [81] Gruninger B, Schoon HA, Schoon D, Menger S, Klug E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *J Comp Pathol.* 1998;119:293-309.
- [82] Betsch JM. Diagnostic de l'infertilité d'origine cervico-utérine chez la jument. *Rec Méd Vét Spécial Reproduction des Equidés.* 1992;168:1011-27.
- [83] Stanton MB, Steiner JV, Pugh DG. Endometrial cysts in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2004;24:14-9.
- [84] Holyoak GR, Ley WB. Management regimens for uterine cysts. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current Therapy in Equine Reproduction.* St Louis: Saunders Elsevier; 2007. p. 121-5.
- [85] Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology.* 2009;71:1396-407.
- [86] Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plontzke J, Drillich M, de la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013;96:4333-9.
- [87] Ahmadi MR, Nazafi S, Ghaisari HR. Comparaison of hormonal changes of oestrus cycle with cytology of cervical mucosa and haematological parameters in dairy heifers. *Comp Clin Pathol.* 2006;94-7.
- [88] Choukroun H, Pineau C. Influence du cycle œstral sur l'inflammation génitale chez la vache Prime' Holstein: École nationale vétérinaire d'Alfort; 2010.
- [89] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J.* 2005;46:255-9.
- [90] Burke CR, Meier S, McDougall S, Compton C, Mitchell M, Roche JR. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010;93:5363-73.
- [91] Carneiro LC, Ferreira AF, Padua M, Saut JP, Ferraudo AS, Dos Santos RM. Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46:1435-9.
- [92] Lima FS, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Ayres H, Favoreto MG, et al. Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F(2)alpha on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 2013;96:6480-8.

- [93] Melcher Y, Prunner I, Drillich M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology*. 2014;82:57-63.
- [94] Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, et al. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*. 2015;83:1249-53.
- [95] Ghanem ME, Tezuka E, Devkota B, Izaike Y, Osawa T. Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function in postpartum dairy cows. *J Reprod Dev*. 2015;61:54-60.
- [96] Galvao KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2009;92:4906-13.
- [97] Johnson H, Torres CG, Carvallo F, Duchens M, Peralta OA. Endometrial expression of selected transcripts in postpartum of primiparous Holstein cows with clinical and subclinical endometritis. *Anim Reprod Sci*. 2015;156:34-9.
- [98] Azawi OI, Omran SN, Hadad JJ. A study of endometritis causing repeat breeding of cycling iraqi buffalo cows. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2008;43:735-43.
- [99] Machado VS, Knauer WA, Bicalho MLS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. a novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. *J Dairy Sci*. 2012;95:1349-57.
- [100] Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed., Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
- [101] Bruun J, Ersboll AK, Alban L. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev Vet Med*. 2002;54:179-90.
- [102] Parkinson T. Infertility and subfertility in the cow: structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections. In: Noakes DE, Parkinson T, England GCW, editors. *veterinary reproduction and obstetrics*. china: Elsevier; 2009. p. 391-581.
- [103] Grohn YT, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: association among host characteristics, disease, and production. *J Dairy Sci*. 1989;72:1876-85.
- [104] Adnane M, Kaidi R, Hanzen C, England GCW. Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: a review. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2017;41:1-11.
- [105] Badinand F. Les métrites chez la vache : influence des facteurs hormonaux et nutritionnels. *Cah Méd Vet*. 1975;44:205-21.
- [106] Sato S, Suzuki T, Okada K. Suppression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. *J Vet Med Sci*. 1995;57:373-5.
- [107] Ducreux P. *Le sélénium chez les bovins : rôles biologiques et manifestations de carences*: ecole vétérinaire de Lyon; 2003.
- [108] Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev*. 2009;10:53-63.
- [109] LeBlanc SJ. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*. 2014;8 Suppl 1:54-63.
- [110] Mayer E. Relations entre alimentation et infécondité. *Bull GTV*. 1978;78:132.
- [111] Hogan JS, Weiss WP, Smith KL. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Sci*. 1993;76:2795-803.

- [112] Chaffaux S, Lakdissi H, Thibier M. Etude épidémiologique et clinique des endométrites post-puerpérales chez les vaches laitières. *Rec Méd Vét.* 1991;167:349-58.
- [113] Francoz G. Observation on the relationship between overfeeding and the incidence of metritis in cows after normal parturition. *Refuah Vet.* 1970;27:148-55.
- [114] Kadivar A, Ahmadi MR, Vatankhah M. Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46:121-6.
- [115] David BB. Observation on metritis in Israeli dairy herds. *Refuah Vet.* 1967;24:108-17.
- [116] Giuliodori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, de la Sota RL. Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: risk factors and reproductive efficiency. *J Dairy Sci.* 2013;96:210-8.
- [117] Thibier M, Steffan J. Les métrites dans la pathologie du post-partum chez la vache laitière. *Epidémiologie et cyclicité in Mieux connaître, comprendre et maîtriser la fécondité bovine. Journée de la société française de buiatrie 1985.* p. 157-83.
- [118] Correa MT, Erb H, Scarlett J. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1993;76:1305-12.
- [119] Salonemi H, Grohn Y, Syvajarvi J. An epidemiological and genetic study on registered diseases in Finnish Ayrshire cattle. II. Reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 1986;27:196-208.
- [120] Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology.* 2000;54:1019-32.
- [121] Hussain AM, Daniel RCW. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. *Theriogenology.* 1992;37:1253-67.
- [122] Morton JM, Butler KL. The effects of induced parturition on the incidence of clinical disease and mortality in dairy cows from commercial herds in south-western Victoria. *Aust Vet J.* 1995;72:1-4.
- [123] Dohoo IR, Martin SW, McMillan I, Kennedy BW. Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows II. Age, season and sire effects. *Prev Vet Med.* 1984;2:655-70.
- [124] Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hillman RB, Powers PA, et al. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1985;68:3337-49.
- [125] Mellado M, Reyes C. Associations between periparturient disorders and reproductive efficiency in Holstein cows in northern Mexico. *Prev Vet Med.* 1994;19:203-12.
- [126] Peeler EJ, Otte MJ, Esslemont RJ. Inter-relationships of periparturient diseases in dairy cows. *Vet Rec.* 1994;134:129-32.
- [127] Benedictus L, Jorritsma R, Knijn HM, Vos PL, Koets AP. Chemotactic activity of cotyledons for mononuclear leukocytes related to occurrence of retained placenta in dexamethasone induced parturition in cattle. *Theriogenology.* 2011;76:802-9.
- [128] Muller LD, Owens MJ. Factors associated with the incidence of retained placentas. *J Dairy Sci.* 1974;57:725-8.
- [129] Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010;93:5764-71.
- [130] Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:295-306.

- [131] Laven RA, Peters AR. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec.* 1996;139:465-71.
- [132] Whiteford LC, Sheldon IM. Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Vet Rec.* 2005;157:202-3.
- [133] Enjalbert F. Relations : alimentation-reproduction chez la vache laitière. *Le point vétérinaire.* 1994:984-91.
- [134] Roche JF. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci.* 2006;96:282-96.
- [135] Guterbock WM. Diagnosis and treatment programs for fresh cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004;20:605-26, vii.
- [136] Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Kronfeld DS. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1985;68:2347-60.
- [137] Markusfeld O. Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J Dairy Sci.* 1987;70:158-66.
- [138] Petit T, Spergser J, Rosengarten R, Aurich J. Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2009;44:88-91.
- [139] LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 2011;76:1610-8.
- [140] Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113:21-9.
- [141] Ingvarsen KL, Moyes K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal.* 2013;7 Suppl 1:112-22.
- [142] Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013;96:2925-38.
- [143] Kehrli ME, Jr., Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res.* 1989;50:207-14.
- [144] Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res.* 1994;55:934-43.
- [145] Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci.* 1997;80:1260-8.
- [146] Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F. Non-specific immunity and ketone bodies. I: In vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1999;46:613-9.
- [147] Markusfeld O. Relationship between overfeeding, metritis and ketosis in high yielding dairy cows. *Vet Rec.* 1985;116:489-91.
- [148] Steffan J. Métrites en élevage bovin laitier. Quelques facteurs influencant leur fréquence et leurs conséquences sur la fertilité. *Rec Méd Vét.* 1987;166:183-8.
- [149] Frazer GS. A rational basis for therapy in the sick postpartum cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2005;21:523-68.
- [150] Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology.* 2008;8:923-34.

- [151] Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J Dairy Sci.* 2006;89:147-54.
- [152] Mani V, Weber TE, Baumgard LH, Gabler NK. Growth and Development Symposium: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *J Anim Sci.* 2012;90:1452-65.
- [153] Sérieys. Le tarissement de la vache laitière. Paris France agricole; 1997.
- [154] Olson JD, Ball L, Mortimer RG, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *Am J Vet Res.* 1984;45:2251-5.
- [155] Galvao KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, et al. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2010;93:2926-37.
- [156] Kaneene JB, Miller R. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Prev Vet Med.* 1995;23:183-200.
- [157] Gautam G, Nakao T, Koike K, Long ST, Yusuf M, Ranasinghe RM, et al. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology.* 2010;73:168-79.
- [158] Gautam G, Nakao T, Yusuf M, Koike K. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Anim Reprod Sci.* 2009;116:175-87.
- [159] Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22:818-29.
- [160] Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology.* 2007;68:549-59.
- [161] Peter AT, Bosu WT, Gilbert RO. Absorption of *Escherichia coli* endotoxin (lipopolysaccharide) from the uteri of postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 1990;33:1011-4.
- [162] Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P, Ziecik AJ. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci.* 2003;76:143-54.
- [163] Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology.* 2009;150:1912-20.
- [164] Levine H. The Repeat Breeder Cow. *Bovine Practitioner* 1999;33:97-105.
- [165] Bretzlaff KN, Whitmore HL, Spahr SL, Ott RS. Incidence and treatments of postpartum reproductive problems in a dairy herd. *Theriogenology.* 1982;17:527-35.
- [166] Bicalho ML, Lima FS, Machado VS, Meira EB, Jr., Ganda EK, Foditsch C, et al. Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis, and pregnancy outcomes in dairy cows. *Theriogenology.* 2016;85:267-74.
- [167] Esslemont D, Kossaibati MA. The Cost of Poor Fertility and Disease in UK Dairy Herds. In: Intervet, editor. UK Ltd2002. p. 146.
- [168] Zegels G, Van Raemdonck GA, Tjalma WA, Van Ostade XW. Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract. *Proteome Sci.* 2010;8:63.

- [169] Van Raemdonck GA, Tjalma WA, Coen EP, Depuydt CE, Van Ostade XW. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PLoS One*. 2014;9:e106488.
- [170] Foley C, Chapwanya A, Creevey CJ, Narciandi F, Morris D, Kenny EM, et al. Global endometrial transcriptomic profiling: transient immune activation precedes tissue proliferation and repair in healthy beef cows. *BMC Genomics*. 2012;13:489.
- [171] Foley C, Chapwanya A, Callanan JJ, Whiston R, Miranda-CasoLuengo R, Lu J, et al. Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of postpartum cytological endometritis. *BMC Genomics*. 2015;16:811.
- [172] Chapwanya A, Meade KG, Foley C, Narciandi F, Evans AC, Doherty ML, et al. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24:1028-39.
- [173] Cronin JG, Hodges R, Pedersen S, Sheldon IM. Enzyme linked immunosorbent assay for quantification of bovine interleukin-8 to study infection and immunity in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73:372-82.
- [174] Lai SK, Wang Y-Y, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61:86-100.
- [175] Shogren R, Gerken TA, Jentoft N. Role of glycosylation on the conformation and chain dimensions of O-linked glycoproteins: light-scattering studies of ovine submaxillary mucin. *Biochemistry*. 1989;28:5525-36.
- [176] Carlstedt I, Sheehan JK. Macromolecular properties and polymeric structure of mucus glycoproteins. *Ciba Found Symp*. 1984;109:157-72.
- [177] Sheehan JK, Kesimer M, Pickles R. Innate immunity and mucus structure and function. *Novartis Found Symp*. 2006;279:155-66; discussion 67-9, 216-9.
- [178] Causey RC. Mucus and the mare: How little we know. *Theriogenology*. 2007;68:386-94.
- [179] Asbury AC, Gorman NT, Foster GW. Uterine defense mechanisms in the mare: Serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus zooepidemicus* by equine neutrophils. *Theriogenology*. 1984;21:375-85.
- [180] Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:726-41.
- [181] Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare : basic and applied aspects*. Cross Plains, Wis.: Equiservices; 1992.
- [182] Troedsson MH, Liu IK. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic uterine infection. *Am J Vet Res*. 1992;53:1641-4.
- [183] Kelly MM, Leigh R, Horsewood P, Gleich GJ, Cox G, Hargreave FE. Induced sputum: validity of fluid-phase IL-5 measurement. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:1162-8.
- [184] Saraswathy Veena V, Sara George P, Jayasree K, Sujathan K. Comparative analysis of cell morphology in sputum samples homogenized with dithiothreitol, N-acetyl-L cysteine, Cytosorb(R) red preservative and in cellblock preparations to enhance the sensitivity of sputum cytology for the diagnosis of lung cancer. *Diagn Cytopathol*. 2015;43:551-8.
- [185] Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau L, Radermecker M, et al. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J*. 1999;13:660-7.
- [186] Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis. *Thorax*. 2002;57:667-71.

- [187] Carr TF, Spangenberg A, Hill JL, Halonen MJ, Martinez FD. Effect of Dithiothreitol on Sputum Interleukin-13 Protein Measurement. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:AB179.
- [188] Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* 1997;6:929-55.
- [189] Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys.* 1989;272:144-51.
- [190] Zhang JG, Moritz RL, Reid GE, Ward LD, Simpson RJ. Purification and characterization of a recombinant murine interleukin-6. Isolation of N- and C-terminally truncated forms. *Eur J Biochem.* 1992;207:903-13.
- [191] Rock FL, Li X, Chong P, Ida N, Klein M. Roles of disulfide bonds in recombinant human interleukin 6 conformation. *Biochemistry.* 1994;33:5146-54.
- [192] Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307:97-101.
- [193] Liggins GC. Initiation of labour. *Biol Neonate.* 1989;55:366-75.
- [194] Bajcsy AC, Szenci O, Doornenbal A, van der Weijden GC, Csorba C, Kocsis L, et al. Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology.* 2005;64:99-111.
- [195] Okano A, Tomizuka T. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology.* 1987;27:369-76.
- [196] Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:152.
- [197] Konigsson K, Gustafsson H, Kindahl H. 15-ketodihydro- PGF₂α, progesterone and uterine involution in primiparous cows with induced retained placenta and post-partial endometritis treated with oxytetracycline and flunixin. *Reprod Dom Anim.* 2002;37:43 - 51.
- [198] Regassa F, Noakes DE. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Vet Rec.* 1999;144:502-6.
- [199] Horadagoda NU, Knox KM, Gibbs HA, Reid SW, Horadagoda A, Edwards SE, et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec.* 1999;144:437-41.
- [200] Tothova C, Nagy O, Seidel H, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet MedCzech.* 2014;59:163-80.
- [201] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft A, Dobson H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec.* 2001;148:172-5.
- [202] Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151:157-62.
- [203] Bekana M. Clinical, ultrasonographic, bacteriological and hormonal studies in postpartum cows with particular emphasis on retained fetal membranes. Sweden: Swedish university of agricultural sciences; 1996.
- [204] Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood.* 2006;108:1751-7.
- [205] Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem.* 2005;280:18562-7.

- [206] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35:163-87.
- [207] Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J.* 1998;334 (Pt 3):489-503.
- [208] Weber A, Weber AT, McDonald TL, Larson MA. Staphylococcus aureus lipoteichoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;109:79-83.
- [209] Chan JP, Chang CC, Hsu WL, Liu WB, Chen TH. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Vet Clin Pathol.* 2010;39:72-8.
- [210] Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun.* 2015;39:143-9.
- [211] Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Zietek J. The concentrations of inflammatory cytokines and acute-phase proteins in the peripheral blood and uterine washings in cows with pyometra. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2015;50:417-22.
- [212] Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek L. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology.* 2015;84:11-8.
- [213] Kim IH, Kang HG, Jeong JK, Hur TY, Jung YH. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Theriogenology.* 2014;82:427-32.
- [214] Adnane M, Chapwanya A, Kaidi R, Meade KG, O'Farrelly C. Profiling inflammatory biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) postpartum: Potential early indicators of bovine clinical endometritis? *Theriogenology.* 2017;103:117-22.
- [215] Healy LL, Cronin JG, Sheldon IM. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci Rep.* 2014;4:7060.
- [216] Healy LL, Cronin JG, Sheldon IM. Polarized Epithelial Cells Secrete Interleukin 6 Apically in the Bovine Endometrium. *Biol Reprod.* 2015;92:151.
- [217] Kania SA, Reed SL, Thomford JW, BonDurant RH, Hirata K, Corbeil RR, et al. Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;78:83-96.
- [218] Sakai M, Ishiyama A, Tabata M, Sasaki Y, Yoneda S, Shiozaki A, et al. Relationship between cervical mucus interleukin-8 concentrations and vaginal bacteria in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2004;52:106-12.
- [219] Luo L, Ibaragi T, Maeda M, Nozawa M, Kasahara T, Sakai M, et al. Interleukin-8 levels and granulocyte counts in cervical mucus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2000;43:78-84.
- [220] Galvao KN, Santos NR, Galvao JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology.* 2011;76:290-9.
- [221] Ghasemi F, Gonzalez-Cano P, Griebel PJ, Palmer C. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology.* 2012;78:1538-47.
- [222] Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body

condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:103.

[223] Salilew-Wondim D, Ibrahim S, Gebremedhn S, Tesfaye D, Heppelmann M, Bollwein H, et al. Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile. *BMC Genomics*. 2016;17:218.

[224] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-88.

[225] Abou Mossallam AA, El Nahas SM, Mahfouz ER, Osman NM. Characterization of buffalo interleukin 8 (IL-8) and its expression in endometritis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2015;13:71-7.

[226] Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*. 2003;60:209-23.

[227] Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. 2002;72:847-55.

[228] Donofrio G, Capocéfalo A, Franceschi V, Price S, Cavirani S, Sheldon IM. The chemokine IL8 is up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/Rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Biol Reprod*. 2010;83:919-28.

[229] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012.

[230] Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. New York: Garland Science; 2012.

[231] Turner ML, Cronin JG, Noleto PG, Sheldon IM. Glucose Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and Innate Immunity in the Bovine Endometrium. *PLoS One*. 2016;11:e0151416.

[232] Little MW, O'Connell NE, Welsh MD, Barley J, Meade KG, Ferris CP. Parturition concentrate supplementation of a diet based on medium-quality grass silage: Effects on performance, health, fertility, metabolic function, and immune function of low body condition score cows. *J Dairy Sci*. 2016;99:7102-22.

[233] Martinez N, Sinedino L, Bisinotto R, Ribeiro E, Gomes G, Lima F, et al. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97:874-87.

[234] Gouwy M, Struyf S, Mahieu F, Put W, Proost P, Van Damme J. The unique property of the CC chemokine regakine-1 to synergize with other plasma-derived inflammatory mediators in neutrophil chemotaxis does not reside in its NH₂-terminal structure. *Mol Pharmacol*. 2002;62:173-80.

[235] Sayeed M. Exuberant Ca²⁺ signaling in neutrophils: a cause for concern. *News Physiol Sci*. 2000;15:130-6.

[236] Jaconi M, Lew D, Carpentier J, Magnusson K, Sjogren M, Stendahl O. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol*. 1990;110:1555-64.

[237] Brechard S, Tschirhart E. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1223-37.

[238] Burgos R, Conejeros I, Hidalgo M, Werling D, Hermosilla C. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;143:1-10.

- [239] Ducusin R, Uzuka Y, Satoh E, Otani M, Nishimura M, Tanabe S, et al. Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res Vet Sci.* 2003;75:27-32
- [240] Martinez N, Risco C, Lima F, Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, et al. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci.* 2012;95:7158-72.
- [241] Bobby J, Kumar H, Gupta HP, Jan MH, Singh SK, Patra MK, et al. Endometritis Increases Pro-inflammatory Cytokines in Follicular Fluid and Cervico-vaginal Mucus in the Buffalo Cow. *Anim Biotechnol.* 2016:1-5.
- [242] Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:55.
- [243] Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach AC. The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol.* 2004;180:203-12.
- [244] Spicer LJ, Alpizar E. Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Domest Anim Endocrinol.* 1994;11:25-34.
- [245] Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction.* 2007;134:683-93.
- [246] Terranova PF, Rice VM. Review: Cytokine Involvement in Ovarian Processes. *Am J Reprod Immunol.* 1997;37:50-63.
- [247] Gorospe WC, Spangelo BL. Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod.* 1993;48:538-43.
- [248] Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Heuwieser W, Drillich M. Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2011;46:520-6.
- [249] Dizien A. Etude interspecifique des cytologies genitales pour le diagnostic de l'endometrite interet diagnostique chez la vache: ecole nationale vétérinaire d'Alfort; 2008.
- [250] Yasui T, McCann K, Gilbert RO, Nydam DV, Overton TR. Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97:2763-70.
- [251] Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology.* 2010;74:1248-55.
- [252] Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Heuwieser W. Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis. *BMC Vet Res.* 2010;6:47.
- [253] Studer E, Morrow DA. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172:489-94.
- [254] Buergelt C. Diseases of the female reproductive tract. In: Mosby S, Louis M, editors. *Color Atlas of Reproductive Pathology of Domestic Animals* 1997. p. 128.

- [255] Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1989;72:68-78.
- [256] Faye B, Barnouin J. Objectivation de la propreté des vaches laitières et des stabulations. L'indice de propreté. *Bulletin Technique, Centre de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Theix.* 1985;59:61-7.
- [257] Paisley LG, Mickelsen WD, Anderson PB. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology.* 1986;25:353–81.
- [258] Joosten I, Sanders M, Hensen E. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Anim Genet.* 1991;22:455–63.
- [259] Kimura K, Goff J, Kehril JM, Reinhardt T. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2002;83:533–50.
- [260] Sheldon IM, Rycroft AN, Zhou C. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet Rec.* 2004;154:289-93.
- [261] Sheldon IM, BAarrett DC, Boyd H. The postpartum period. In: Andrews AH, editor. *Bovine Medicine.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2004. p. 508-29.
- [262] Bretzlaff K. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1987;3:593-607.
- [263] Madoz LV, Ploentzke J, Albarracin D, Mejia M, Drillich M, Heuwieser W, et al. Prevalence of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and the impact on reproductive performance. 16th International Congress on Animal Reproduction. Budapest, Hungary2008. p. 51.
- [264] De la Sota RL, Magnasco M, RP M. Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. 16th International Congress on Animal Reproduction. Budapest, Hungary2008. p. 36.
- [265] Toni F, Vincenti L, Ricci A, Schukken YH. Postpartum uterine diseases and their impacts on conception and days open in dairy herds in Italy. *Theriogenology.* 2015.
- [266] Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50:380–8.
- [267] Vieira-Neto A, Gilbert RO, Butler WR, Santos JE, Ribeiro ES, Vercouteren MM, et al. Individual and combined effects of anovulation and cytological endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97:5415-25.
- [268] Cone RA. Chapter 4 - Mucus A2 - Mestecky, Jiri. In: Lamm ME, McGhee JR, Bienenstock J, Mayer L, Strober W, editors. *Mucosal Immunology (Third Edition).* Burlington: Academic Press; 2005. p. 49-72.
- [269] Cleland WW. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry.* 1964;3:480-2.
- [270] Crowe MA, Williams EJ. Triennial Lactation Symposium: Effects of stress on postpartum reproduction in dairy cows. *J Anim Sci.* 2012;90:1722-7.
- [271] Lambertz C, Volker D, Janowitz U, Gauly M. Evaluation of vaginal discharge with the Metricheck device and the relationship to reproductive performance in postpartum dairy cows. *Anim Sci J.* 2014;85:848-52.
- [272] Aggarwal BB, Heber D. *Immunonutrition: Interactions of Diet, Genetics, and Inflammation:* CRC Press; 2014.
- [273] De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol.* 2010;11:1039-46.

[274] Linke RP, Bock V, Valet G, Rothe G. Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;176:1100-5.

Annexes

Annexe I

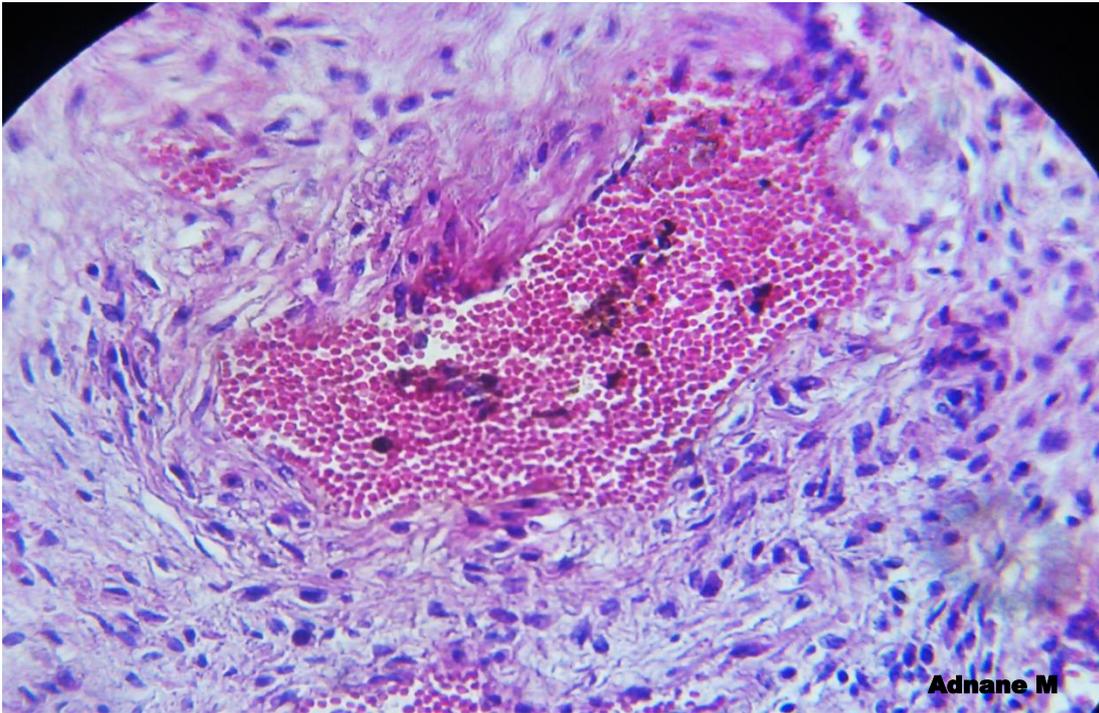


Figure 48: Coupe histologique au niveau de l'utérus montrant une forte congestion avec hémorragie de l'endomètre (X 1000).

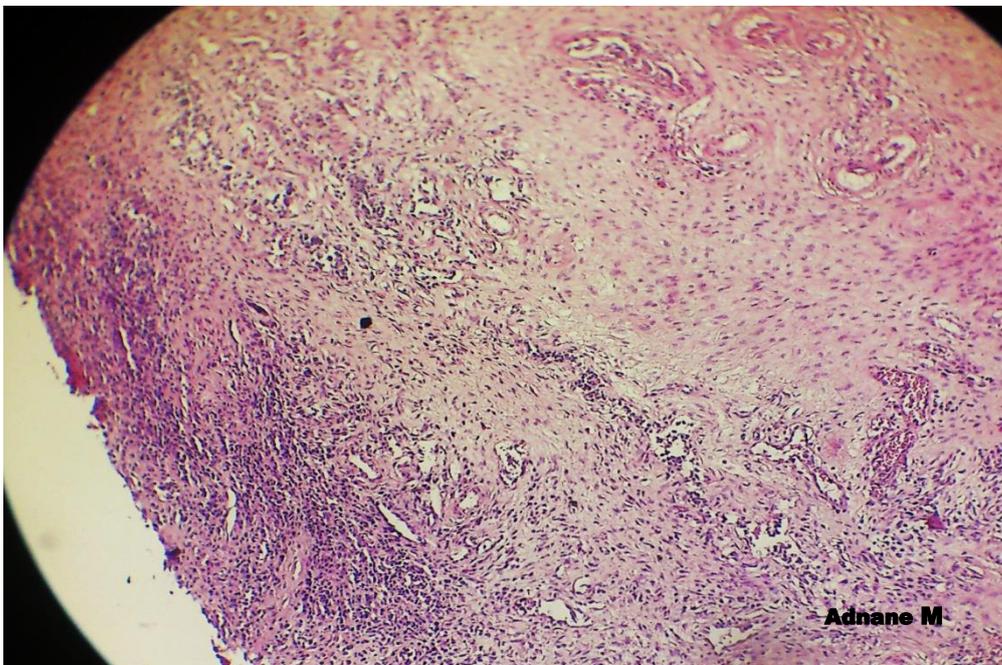


Figure 49: Coupe histologique montrant une forte infiltration leucocytaire du stratum compactum avec la disparition totale de l'épithélium endométrial (X 200)

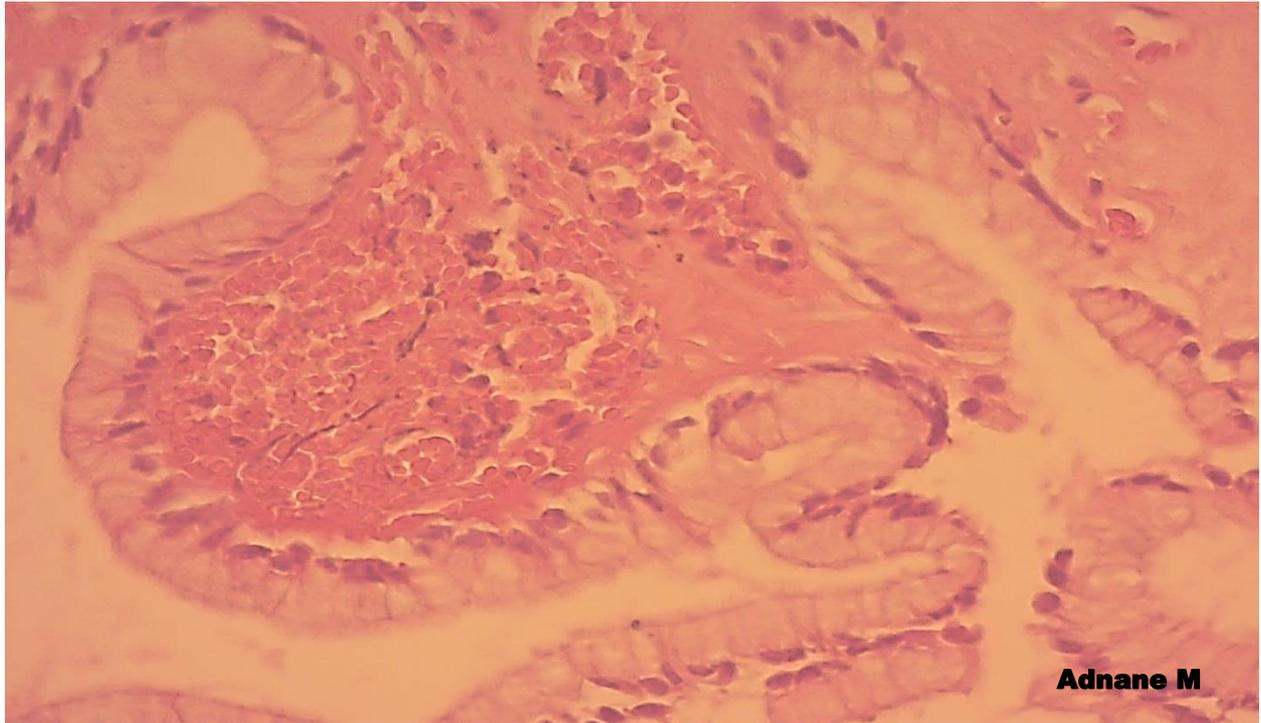


Figure 50: Coupe histologique montrant une forte congestion et hémorragie de l'endomètre (x 600)

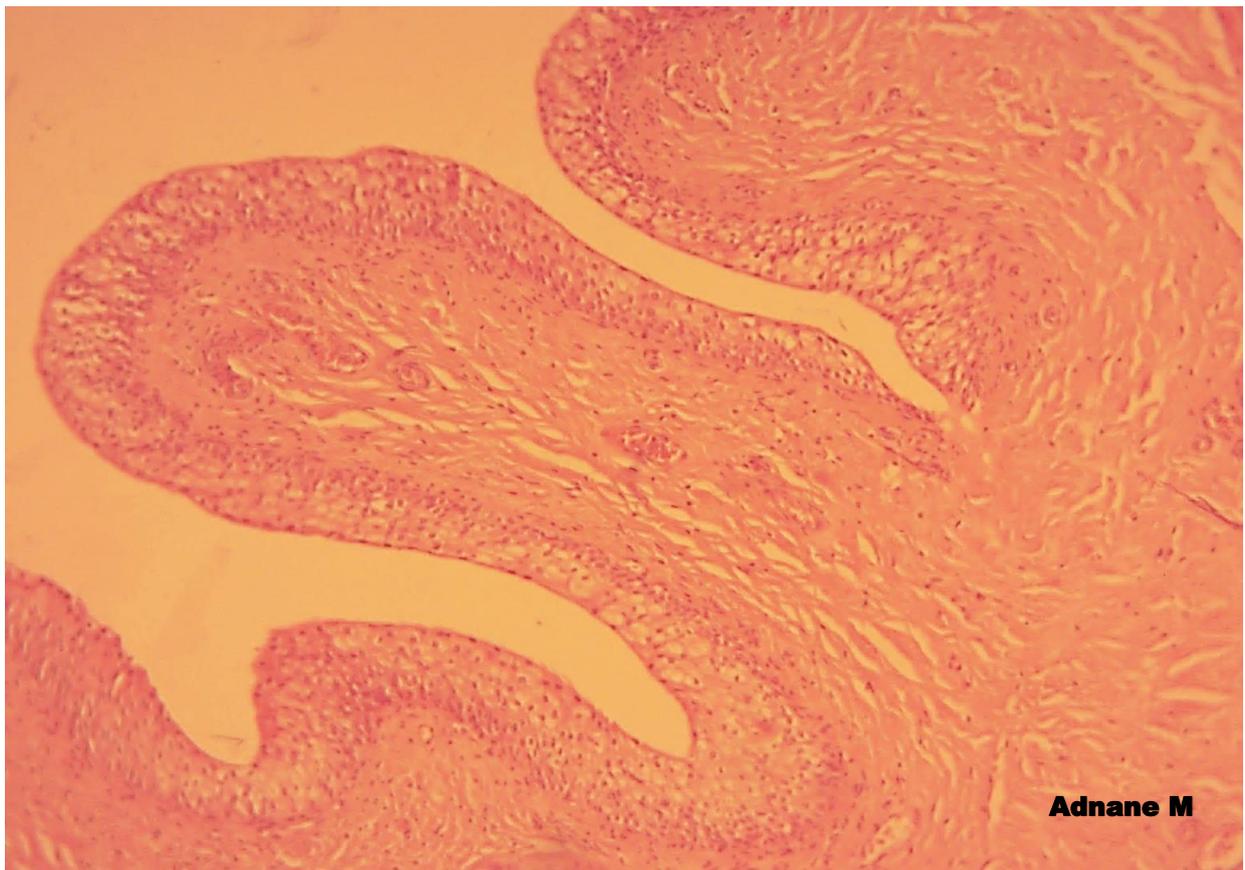


Figure 51: Coupe histologique montrant un épithélium endométrial intact, avec une rareté des glandes endométriales (X 400)

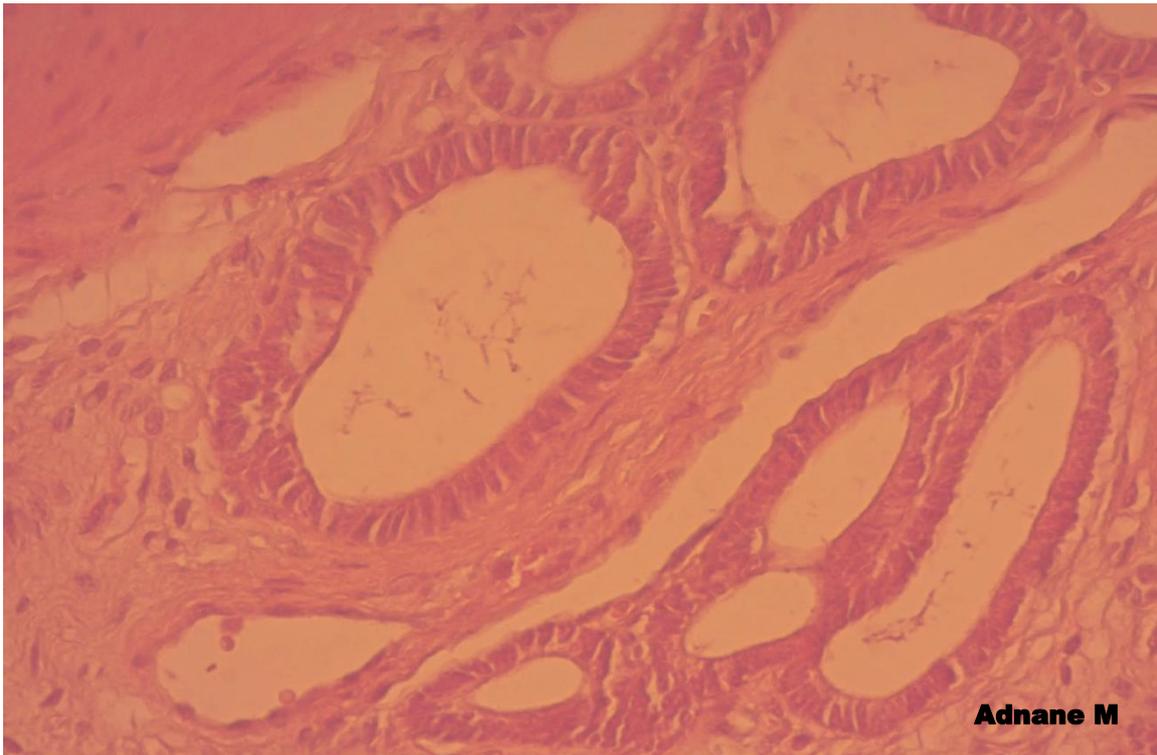


Figure 52: Coupe histologique montrant une forte dilatation kystique des glandes sous l'effet de l'étranglement et de l'obstruction de leurs canaux excréteurs (X 1000).

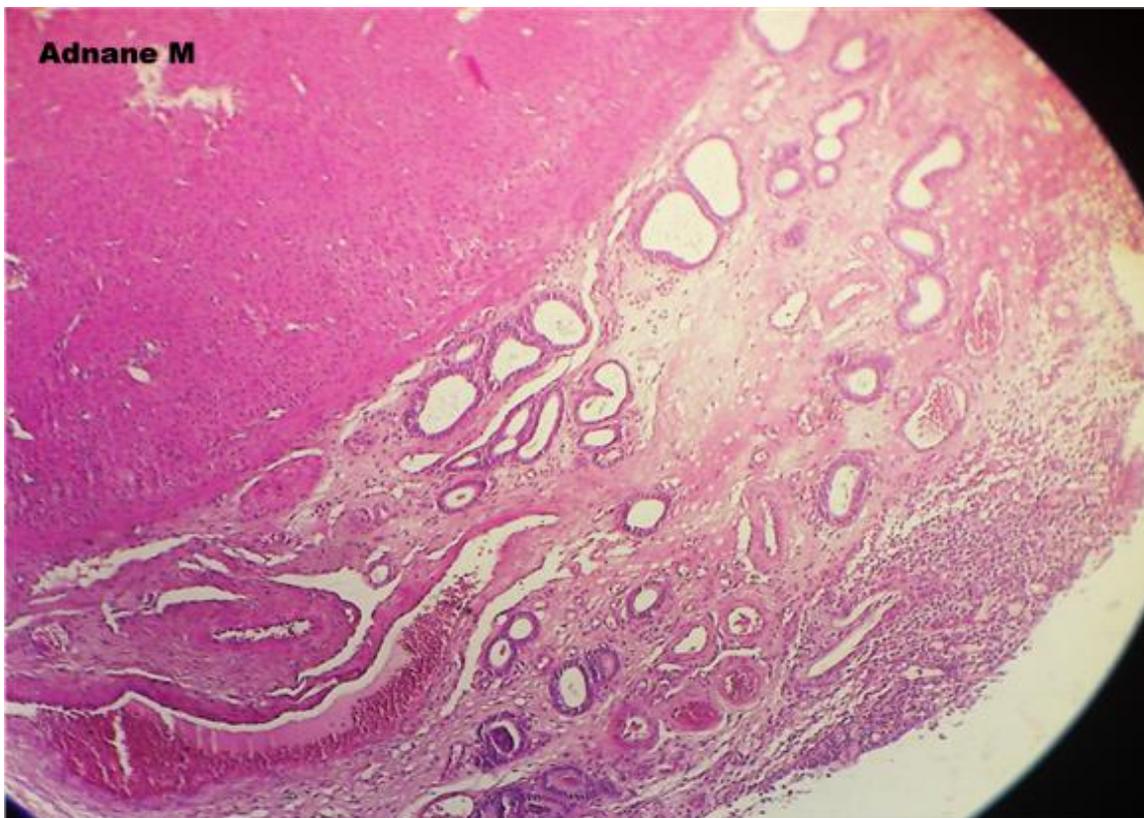


Figure 53: Coupe histologique montrant la disparition de l'épithélium endométriale avec une forte infiltration leucocytaire, notamment le stratum compactum. Congestion vasculaire est œdème sont aussi remarquables (x 200)

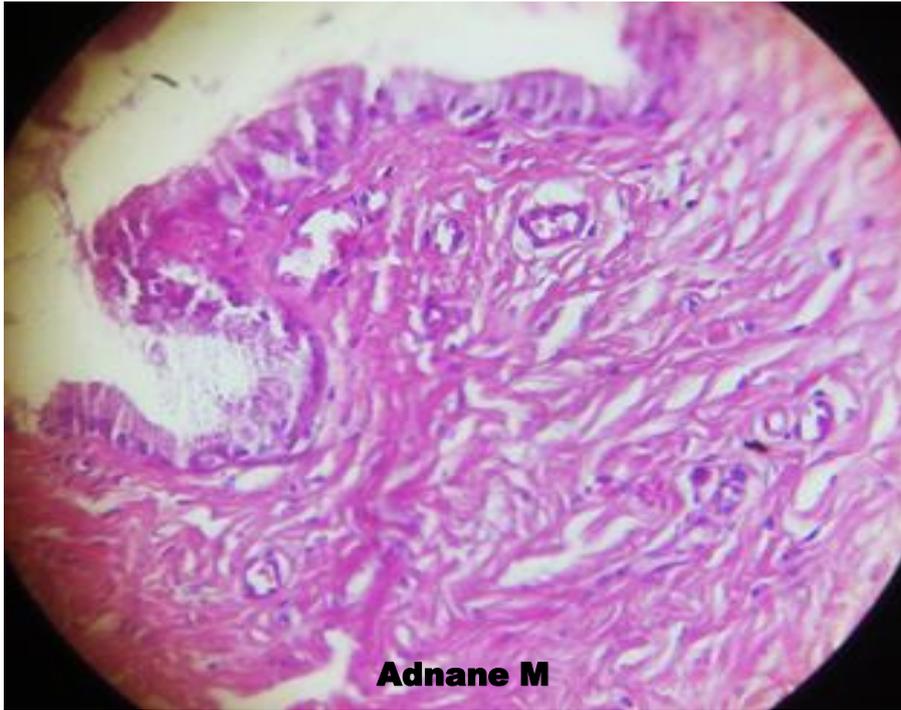


Figure 54: coupe histologique montrant un endomètre au début de l'involution utérine (8^{ème} jour du postpartum) (X 1000).

Annexe II

FICHE DE NOTATION DES EXAMENS ET DE RECUEIL DES DONNÉES

EXAMEN : .../...../.....

ID N° :

- Date de vêlage : jours du postpartum :

NUMÉRO DE LACTATION :

- 1^{ère} lactation : 2^{ème} lactation : 3^{ème} lactation : autres :

PRODUCTION LAITIÈRE :

- < 10 kg/J: 10-15 kg/j >15-20 kg/j >20 kg/j:

SAISON DU VÊLAGE :

- Hiver : été : automne : printemps

ANTÉCÉDENT DE LA VACHE

- Dystocie : Rétention placentaire : Jumellité : mortinatalité :
 Hypocalcémie : cétose : avortement :
 1^{ère} chaleur du PP du cycle précédent : Date de 1^{ère} IA : date d'IF : N° IA/IF

RÉTENTION PLACENTAIRE :

- oui non

DYSTOCIE :

- Assistance de vêlage : césarienne :

DURÉE DE GESTATION PRÉCÉDENTE :

- <270 jours : >270 jours :

INDUCTION DE VÊLAGE :

- Hormonale : médicamenteuse :

NOMBRE DE VEAUX :

- 1 : 2 :

SEXE DU VEAU :

- Male : femelle :

MORTINATALITÉ

- Oui : non :

DÉPLACEMENT DE LA CAILLETTE :

- Son « Ping » à l'auscultation : déjà diagnostiquée par un vétérinaire :

HYPOCALCÉMIE :

- Faiblesse : peau froide : décubitus : repense au calcium : déjà diagnostiquée :

CÉTOSE :

- Anorexie : dépression : odeur d'acétone dans l'haleine : déjà diagnostiquée :

MÉTRITE :

- Utérus élargie : décharge utérine fétide : signes systémiques : déjà diagnostiquée :

MAMMITE CLINIQUE :

- Grumeaux dans le lait : signes d'inflammation mammaire :

BCS (D'APRÈS BAZIN, 1984) :

- 1 : 1.5 : 2 : 2.5 : 3 : 3.5 : 4 : 4.5 : 5 :

SOUILLURE DE L'ARRIÈRE TRAIN (D'APRÈS FAYE, 1985) : OU CELLE DE (SCHREINER ET RUEGG, 2002)

- | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| • Région ano-génitale | <input type="checkbox"/> 0 : | <input type="checkbox"/> 0.5 : | <input type="checkbox"/> 1 : | <input type="checkbox"/> 1.5 : | <input type="checkbox"/> 2 : |
| • Mamelle vue arrière | <input type="checkbox"/> 0 : | <input type="checkbox"/> 0.5 : | <input type="checkbox"/> 1 : | <input type="checkbox"/> 1.5 : | <input type="checkbox"/> 2 : |
| • Région pied-jarret | <input type="checkbox"/> 0 : | <input type="checkbox"/> 0.5 : | <input type="checkbox"/> 1 : | <input type="checkbox"/> 1.5 : | <input type="checkbox"/> 2 : |
| • Mamelle vue de coté | <input type="checkbox"/> 0 : | <input type="checkbox"/> 0.5 : | <input type="checkbox"/> 1 : | <input type="checkbox"/> 1.5 : | <input type="checkbox"/> 2 : |
| • Cuisse | <input type="checkbox"/> 0 : | <input type="checkbox"/> 0.5 : | <input type="checkbox"/> 1 : | <input type="checkbox"/> 1.5 : | <input type="checkbox"/> 2 : |

- Score globale :

ANGLE DE LA VULVE

< 70° :

> 70° :

DIAGNOSTIC :

- Structures présentes au niveau des ovaires :

	Ovaire droit	Ovaire gauche
Lisse		
Follicule cavitaire		
Corps jaune		
Kyste		

- Cytobrosse : Date du PP :

N° lame (1) :

%PMN :

N° lame (2) :

%PMN :

Nombre de cellules	Lame 1	Lame 2	moyenne
Monocytes/macrophages			
Lymphocytes			
Basophiles			
Éosinophiles			
Polynucléaires neutrophiles			
Cellules épithéliales			

- Examen du contenu vaginal : Score de l'aspect 0 : 1 : 2 : 3 :
Score de l'odeur 0 : 1 :

- Biopsie :

Corne présumé gestante / N° lame :

Score inflammatoire 0 : 1 : 2 : 3 :

Corne présumé non gestante / N° lame :

Score inflammatoire 0 : 1 : 2 : 3 :

	Critère (Bonnett et al, 1991a, modifié)	Corne gravide	Corne vide
Épithélium	Hauteur (épithélium intacte mesurée à 40x)
	Type de cellules	(1) Cyindrique (2) Cuboïdale (3) Aplatie
	Cellules inflammatoires (nombre mesuré à 10x)	Mononucléaires Polynucléaires
Stratum compactum	Cellules inflammatoires (nombre au-dessous de la membrane basale 63x)	Mononucléaires Polynucléaires
	Foyers lymphocytaires (nombre mesuré à 10x)	
Stratum spongium	Foyers lymphocytaires (nombre mesuré à 10x)	
Glandes	Concentration (nombre au-dessous de la membrane basale 10x)	(0) Absentes (1) Dispersées (2) Modéré (3) Forte
	Type	(1) Droites (2) Enroulées
	Taille (diamètre glandulaire interne et externe)	Externe Interne
	Glandes Dilatées	(0) Absence (1) Présence

	Fibrose (nombre de couche aux tours des glandes, selon Kenney, 1978)	(0) Absente
		(1) Légère
		(2) Modérée
		(3) Intense

- Température rectale :

TRAITEMENT DES ENDOMETRITES :

- Métricure® : N° applicateurs : date (JPP)
- PGF2alpha/ principe actif : nom commercial : Dose..... mg:
Voie d'administration : N° d'injections : date (JPP) :
- Autres :

Annexe III



Figure 55 : Photos montrant une des étables concernées par l'étude immunologique du MCV (Irlande).

Annexe IV

CervicoVaginal Fluid Collection Data Sheet

Date:	Farm	Cow number									
	
Clinical history of cow											
Age											
Body Condition Score (BCS)											
Parity											
Days postpartum											
Calving ease (No assistance, Manual Assistance, Caesarean)											
Retained Foetal Membranes (RFM) (Yes/No)											
Any other clinical manifestations											
Clinical examination											
Temperature											
Pulse and heart rate											
Respiration rate											
Vaginal Examination											
Cervix opening (how many finger; 1, 2, 3, ...)											
Residual placental tissue (Yes/No)											
Mucus aspect score (White; Yellow; Red; Translucid)											
Fetid odour (Yes/No)											
Volume of mucus (ml)											
Other remarks											

Annexe V



Figure 56 : Photo montrant la technique de prélèvement manuelle du MCV par voie vaginale



Figure 57 : Photo montrant la préparation des frottis cytologiques à partir du CVM

Annexe VI

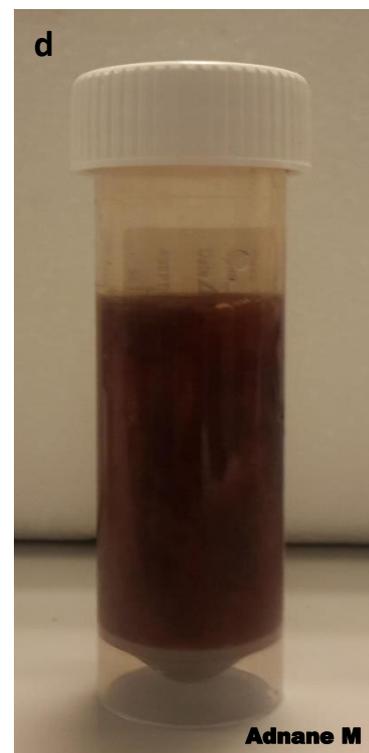
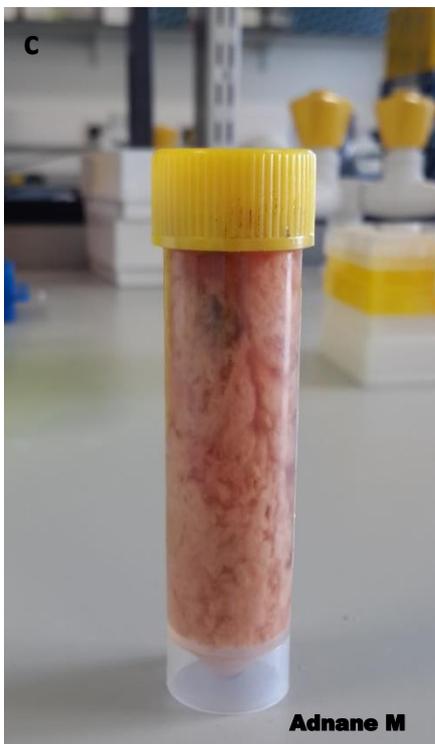


Figure 58 : Aspect macroscopique du MCV. (a) MCV avec quelques flocons de pus (score 1), (b) MCV avec aspect muco-purulent et sanguinolent (score 3), (c) MCV d'aspect purulent et sanguinolent (score 3), (d) MCV sanguinolent (score 3)

Annexe VII



Thermo Scientific Rapid-Chrome Kwik-Diff Staining System Instructions for Use

For in vitro diagnostic use.

For staining blood smears, FNAs, and bone marrow.

This special staining kit simplifies the routine staining for quick differential stains. Its compact size makes it ideal for FNA carts. With the Thermo Scientific™ Rapid-Chrome™ Kwik-Diff™ Kit, all the necessary reagents and accessories are packaged in one convenient carrying tray. The 90 mL/ea. reagent jars are sequentially arranged to simplify staining. Die cut slots in the tray base accommodate their respective jar lids and minimize the potential for cross-contamination. This kit can stain approximately 100 slides, although the actual number may vary depending on specimen type and staining technique. Nearly all the kit components may be purchased individually.

Kit Components

1. Reagent 1 (Methanol) – 90 mL
2. Reagent 2 (Eosin) – 90 mL
3. Reagent 3 (Methylene Blue) – 90 mL
4. DI Water Rinse – 90 mL x 2
5. Spill-Free Slide Jar – 1 Jar (holds 10 slides)
6. Thermo Scientific Coverglass – 2 packs (24 mm x 50 mm, #1s)
7. Resin Mountant – 1 bottle (30 mL)
8. Thermo Scientific Secureline Marker – 1 each
9. Thermo Scientific Colorfrost Slides – 1 box (144/box)
10. Modified Plastic Slide Grip – 1 each (holds 5 slides)
11. Cardboard Slide Folder – 1 each (holds 20 slides)

Storage Instructions

Keep away from direct sunlight. Store at room temperature. Do not handle or store near heat, sparks, flames or strong oxidants.

Lot number and expiration date are printed on the reagent jars.

Instructions for Use

All required reagents are provided in the tray and supplied ready-to-use.

After staining and rinsing, slides may be air dried or examined wet. Specimen slides may be made permanent by immersing completely dried specimens in xylene for several seconds then mounting with resin mounting medium and a coverslip.

Specimens

Either capillary or venous blood is acceptable for making blood films. If no anticoagulant is employed, the blood film must be made immediately. Should an anticoagulant be required, EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, is currently preferred.

Staining Procedure for Blood Smears and Bone Marrow

1. Prepare a film of blood or bone marrow on a microscope slide and allow to dry.
2. Dip slide or rack of slides five times (1 second per dip) into Reagent #1. Allow excess to drain into jar or dish and blot edge on absorbent paper.
3. Dip slide or rack of slides five times (1 second per dip) into Reagent #2. Allow excess to drain into jar or dish and blot edge on absorbent paper.
4. Dip slide or rack of slides five times (1 second per dip) into Reagent #3. Allow excess to drain into jar or dish and blot edge on absorbent paper.
5. Rinse slide or rack of slides by dipping or swishing in distilled or deionized water.
6. Air dry slide(s) or use warm air blower before mounting with oil and reading.

Note: Tone and depth of color may be adjusted as follows:

1. Too blue – Decrease 1 dip in Reagent #3.
2. Too red – Decrease 1 dip in Reagent #2.
3. Too dark – Decrease by 1 or 2 dips in Reagents #2 and #3.
4. Too light – Increase by 1 or 2 dips in both Reagents #2 and #3.

A minimum of 3 dips of 1 second each in Reagent #2 and #3 is required. Always dip slide in Reagent #1 a minimum of 5, 1 second dips.

Note: For bone marrow smears, double the above times.

Specimen Storage

If smears cannot be stained within 4-6 hours of preparation, they should be fixed with methanol and then stained as convenient.

Expected Results

1. Erythrocytes: Pink tan with degrees of chromasia.
2. WBCs: Nuclei with bright, bluish-purple chromatin, light blue nucleoli.
3. Lymphocytes: Clear blue cytoplasm, red-purple granules may be present.
4. Monocytes: Mosaic of pink and blue cytoplasm, azure granules usually present.
5. Neutrophils: Light purplish-pinkish or lavender granules in cytoplasm.
6. Eosinophils: Bright red or reddish-orange granules in cytoplasm.
7. Basophils: Deep purple and violet-black granules in cytoplasm.
8. Platelets: Clearly demarcated red-purple granules in light blue cytoplasm.

The reaction of cytoplasm to staining is subject to a great many variables. Since the majority of staining occurs during the buffering stage, the variable of greatest magnitude is the resultant pH of the stain/buffer mixture at the cellular surfaces. The overall color of the red blood cells is a guide to stain quality and should be used in adjusting staining times for desired results.

Limitations of Procedure

A truly representative blood smear and bone marrow are diagnostic tools of inestimable value to the clinician. The course of a disease is often monitored by the routine "differential." Therefore, it is to be stressed that the information gathered from the blood smear is only as accurate as the preparation of the film, from specimen collection and spreading, to drying and final staining of the resultant smear.

Warnings and Precautions

For in vitro diagnostic use only.

Reasonable care should be taken when using all laboratory reagents. Use with adequate ventilation. Keep away from direct sunlight.

See Kwik-Diff Stain Kit Safety Data Sheets for active ingredients, warnings and precautions as well as EUH code definitions.

Order Information

Product	Qty.	REF
Rapid-Chrome Kwik-Diff Staining System	1 Kit	9990702

Replacement Components

Product	Qty.	REF
Kwik-Diff Staining Kit (Reagents 1, 2, & 3)	500 mL/each	9990700
Kwik-Diff Reagent #1	4 L	9990705
Kwik-Diff Reagent #2	4 L	9990706
Kwik-Diff Reagent #3	4 L	9990707
Spill-free Slide Jar	1 each	1001362
Spill-free Slide Jar	12 jars	1001363
Coverglass (24 x 50, #1s)	1 case	102450
Synthetic Mountant	2 x 500 mL	6769007
Secureline® Marker (black)	1 marker	1451
Colorfrost® White-End Slides	1440/case	4445
Modified Slide Grip (plastic)	1 grip	1975
Slide Folder (holds 20 slides)	1 each	1604

©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries.

Anatomical Pathology



238570 R10/15



Richard-Allan Scientific
Subsidiary of Thermo Fisher Scientific
4481 Campus Drive, Kalamazoo, MI 49008
Phone: 1 (800) 522-7270
Phone: + 1 (269) 544-5600
www.thermoscientific.com/pathology



Thermo Shandon Limited
Subsidiary of Thermo Fisher Scientific
Tudor Road, Manor Park,
Runcorn, Cheshire WA7 1TA, UK
Phone: +44 (0) 1928 534 050
Fax: + 44 (0) 1928 534 049



Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand

Annexe VIII

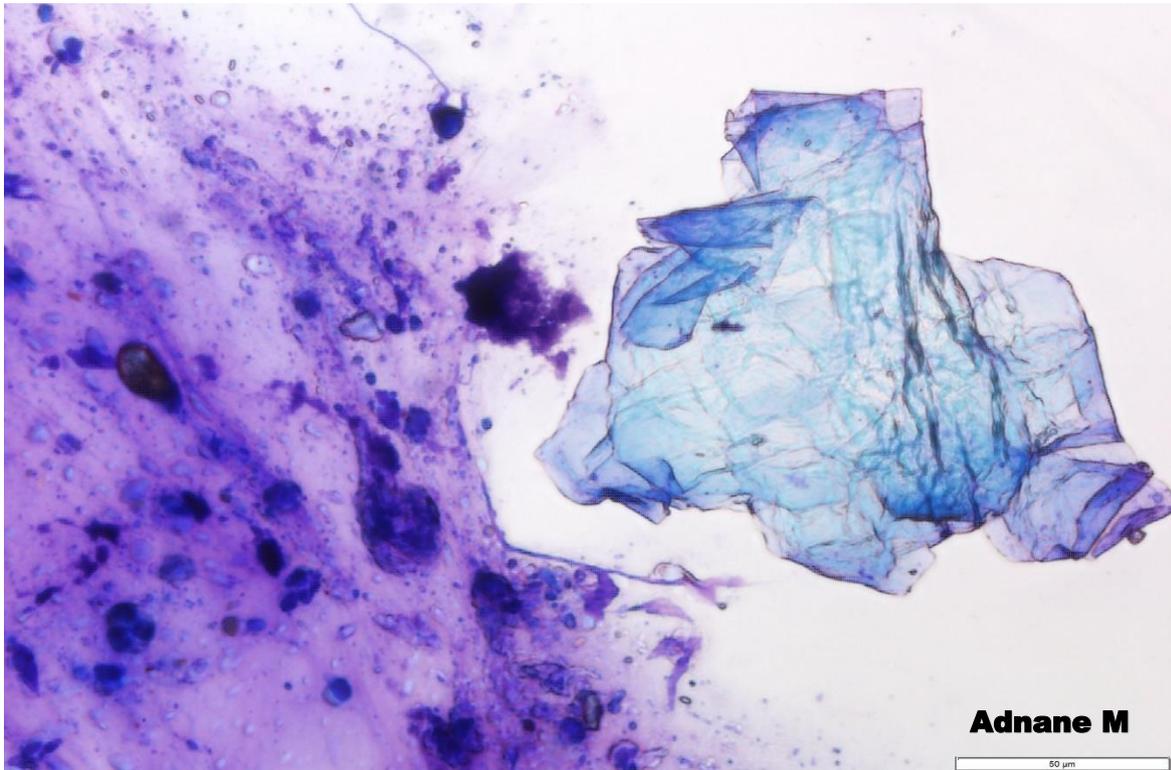


Figure 59 : Frottis cytologique à partir du MCV montrant une squameuse cellule épithéliale vaginale. X400 ; barre = 50 μm .

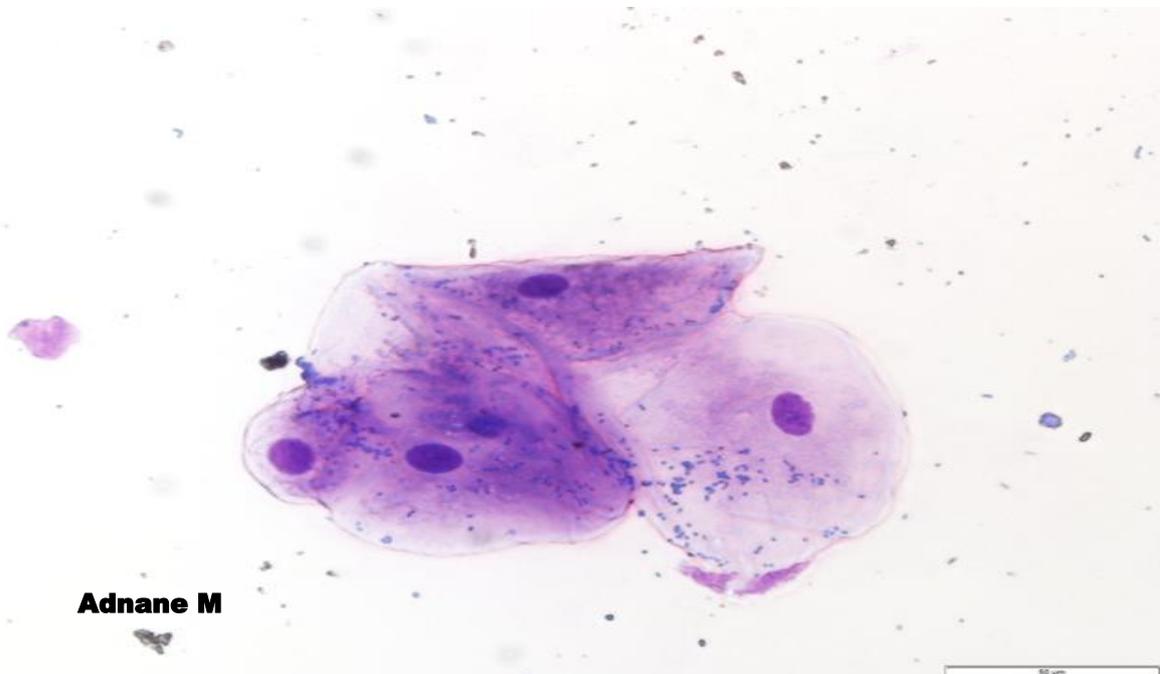


Figure 60 : Frottis cytologique à partir du MCV montrant des cellules épithéliales vaginales épithéliale superficielles. X400 ; barre = 50 μm .

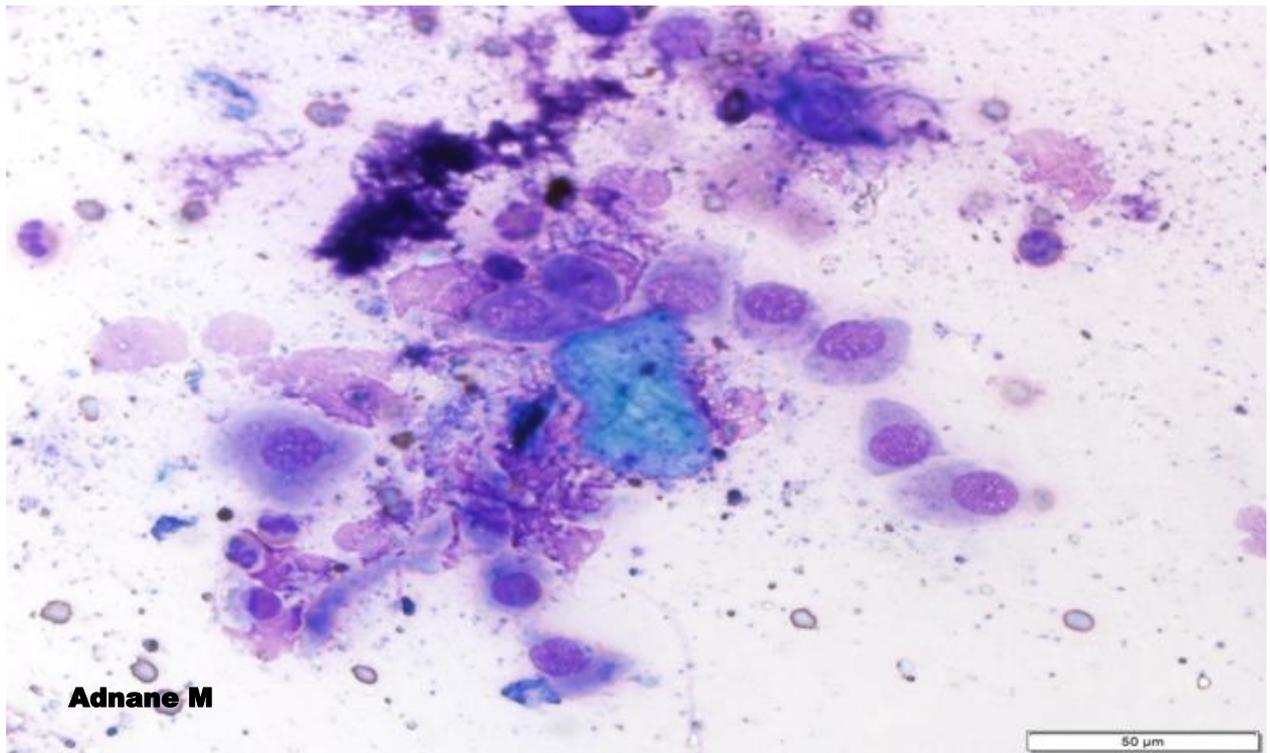


Figure 61 : Frottis cytologique à partir du MCV montrant des cellules épithéliales squameuses (#) et des cellules endométriales (*). X400 ; barre = 50 μ m.

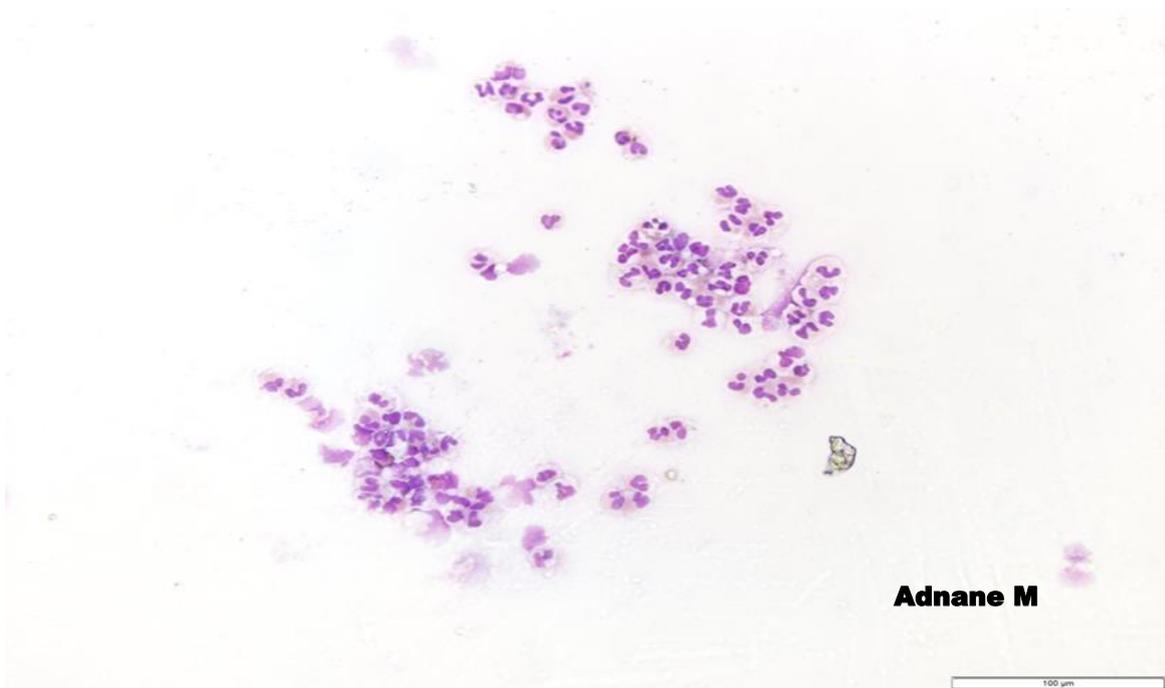


Figure 62 : Frottis cytologique à partir du MCV montrant une abondante infiltration leucocytaire. X200 ; barre = 100 μ m

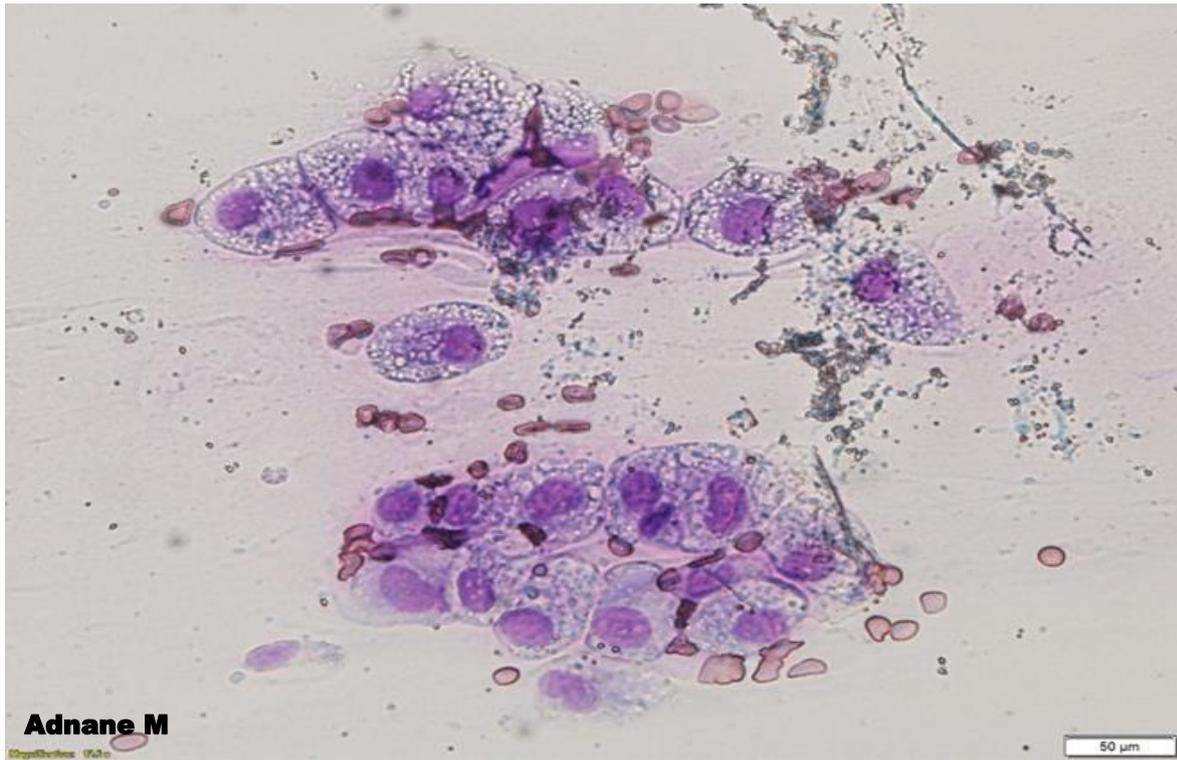


Figure 63 : Frottis cytologique à partir du MCV montrant une abondante cellule de macrophage. X400 ; barre = 50 μ m

INSTRUCTIONS



Pierce™ BCA Protein Assay Kit

23225 23227

1296.9

Number	Description
23225	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 500 test-tube or 5000 microplate assays
23227	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 250 test-tube or 2500 microplate assays

Kit Contents:

BCA Reagent A, 1000mL (in Product No. 23225) or 500mL (in Product No. 23227), containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide

BCA Reagent B, 25mL, containing 4% cupric sulfate

Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at 2mg/mL in 0.9% saline and 0.05% sodium azide

Storage: Upon receipt store at room temperature. Product shipped at ambient temperature.

Note: If either Reagent A or Reagent B precipitates upon shipping in cold weather or during long-term storage, dissolve precipitates by gently warming and stirring solution. Discard any kit reagent that shows discoloration or evidence of microbial contamination.

Table of Contents

Introduction	1
Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures).....	2
Test Tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)	3
Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)	3
Troubleshooting	4
Related Thermo Scientific Products	5
Additional Information	5
References	6

Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay is a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu^{+2} to Cu^{+1} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+1}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid.¹ The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20-2000µg/mL). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA.² Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups.² Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknown(s) before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is required, it is advisable to select a protein

standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see Related Thermo Scientific Products) may be used when assaying immunoglobulin samples.

Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10-25µL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is 1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of 2mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

Table 1. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5-250µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

- Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$$

Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:

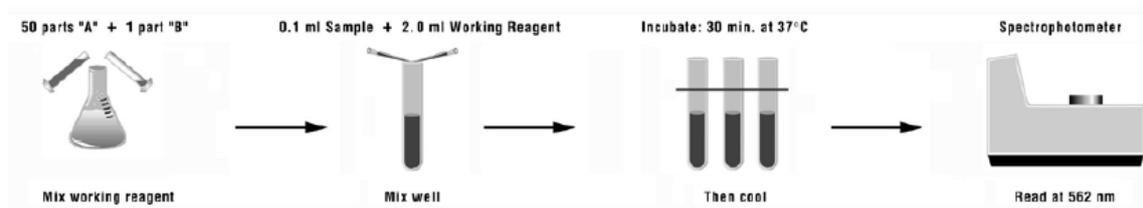
$$(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2\text{mL}) = 48\text{mL WR required}$$

Note: 2.0mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200 µl of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

- Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50mL of Reagent A with 1mL of Reagent B.

Note: When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

Procedure Summary (Test-tube Procedure, Standard Protocol)



Test-tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)

1. Pipette 0.1mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
2. Add 2.0mL of the WR to each tube and mix well.
3. Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
 - Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20-2000µg/mL)
 - RT Protocol: RT for 2 hours (working range = 20-2000µg/mL)
 - Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5-250µg/mL)

Notes:

- Increasing the incubation time or temperature increases the net 562nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
 - Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.
4. Cool all tubes to RT.
 5. With the spectrophotometer set to 562nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water. Subsequently, measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.

Note: Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.
 6. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.
 7. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)

1. Pipette 25µL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2000µg/mL) (e.g., Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).

Note: If sample size is limited, 10µL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2000µg/mL.

2. Add 200µL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.
4. Cool plate to RT. Measure the absorbance at or near 562nm on a plate reader.

Notes:

- Wavelengths from 540-590nm have been used successfully with this method.
- Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.
- Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.

5. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in $\mu\text{g/mL}$. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Note: If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
No color in any tubes	Sample contains a copper chelating agent	Dialyze, desalt or dilute sample Increase copper concentration in working reagent (e.g., use 50:2, Reagent A:B) Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
Blank absorbance is OK, but standards and samples show less color than expected	Strong acid or alkaline buffer, alters working reagent pH	Dialyze, desalt, or dilute sample
	Color measured at the wrong wavelength	Measure the absorbance at 562nm
Color of samples appears darker than expected	Protein concentration is too high	Dilute sample
	Sample contains lipids or lipoproteins	Add 2% SDS to the sample to eliminate interference from lipids ³ Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
All tubes (including blank) are dark purple	Buffer contains a reducing agent	Dialyze or dilute sample
	Buffer contains a thiol	Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
	Buffer contains biogenic amines (catecholamines)	
Need to measure color at a different wavelength	Spectrophotometer or plate reader does not have 562nm filter	Color may be measure at any wavelength between 540nm and 590nm, although the slope of standard curve and overall assay sensitivity will be reduced

A. Interfering substances

Certain substances are known to interfere with the BCA assay including those with reducing potential, chelating agents, and strong acids or bases. Because they are known to interfere with protein estimation at even minute concentrations, avoid the following substances as components of the sample buffer:

Ascorbic acid	EGTA	Iron	Impure sucrose
Catecholamines	Impure glycerol	Lipids	Tryptophan
Creatinine	Hydrogen peroxide	Melibiose	Tyrosine
Cysteine	Hydrazides	Phenol Red	Uric acid

Other substances interfere to a lesser extent with protein estimation using the BCA assay, and these have only minor (tolerable) effects below a certain concentration in the original sample. Maximum compatible concentrations for many substances in the Standard Test Tube Protocol are listed in Table 2 (see last page of Instructions). Substances were compatible at the indicated concentration in the Standard Test Tube Protocol if the error in protein concentration estimation caused by the presence of the substance was less than or equal to 10%. The substances were tested using WR prepared immediately before each experiment. Blank-corrected 562nm absorbance measurements (for a 1000 $\mu\text{g/mL}$ BSA standard + substance) were compared to the net 562nm measurements of the same standard prepared in 0.9% saline. Maximum compatible concentrations will be lower in the Microplate Procedure where the sample to WR ratio is 1:8 (v/v).

Furthermore, it is possible to have a substance additive affect such that even though a single component is present at a concentration below its listed compatibility, a sample buffer containing a combination of substances could interfere with the assay.

B. Strategies for eliminating or minimizing the effects of interfering substances

The effects of interfering substances in the Pierce BCA Protein Assay may be eliminated or overcome by one of several methods.

- Remove the interfering substance by dialysis or gel filtration.
- Dilute the sample until the substance no longer interferes. This strategy is effective only if the starting protein concentration is sufficient to remain in the working range of the assay upon dilution.
- Precipitate the proteins in the sample with acetone or trichloroacetic acid (TCA). The liquid containing the substance that interfered is discarded and the protein pellet is easily solubilized in ultrapure water or directly in the alkaline BCA WR.⁴ A protocol detailing this procedure is available from our website. Alternatively, Product No. 23215 may be used (see Related Thermo Scientific Products).
- Increase the amount of copper in the WR (prepare WR as 50:2 or 50:3, Reagent A:B), which may eliminate interference by copper-chelating agents.

Note: For greatest accuracy, the protein standards must be treated identically to the sample(s).

Related Thermo Scientific Products

15041	Pierce 96-Well Plates, 100/pkg.
15075	Reagent Reservoirs, 200/pkg.
15036	Sealing Tape for 96-Well Plates, 100/pkg.
23209	Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA)
23208	Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set, 7 × 3.5mL
23212	Bovine Gamma Globulin Standard, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules
23213	Pre-Diluted Protein Assay Standards, (BGG) Set, 7 × 3.5mL aliquots
23235	Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, working range of 0.5-20µg/mL
23236	Coomassie Plus™ (Bradford) Assay Kit, working range of 1-1500µg/mL
23215	Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set
23250	Pierce BCA Protein Assay Kit—Reducing Agent Compatible

Additional Information

A. Please visit our website for additional information including the following items:

- Tech Tip #8: Eliminate interfering substances from samples for BCA Protein Assay

B. Alternative Total Protein Assay Reagents

If interference by a reducing substance or metal-chelating substance contained in the sample cannot be overcome, try the Thermo Scientific Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Product No. 23236), which is less sensitive to such substances.

C. Cleaning and Re-using Glassware

Exercise care when re-using glassware. All glassware must be cleaned and given a thorough final rinse with ultrapure water.

D. Response characteristics for different proteins

Each of the commonly used total protein assay methods exhibits some degree of varying response toward different proteins. These differences relate to amino acid sequence, pI, structure and the presence of certain side chains or prosthetic groups that can dramatically alter the protein's color response. Most protein assay methods use BSA or immunoglobulin (IgG) as the standard against which the concentration of protein in the sample is determined (Figure 1). However, if great accuracy is required, prepare the standard curve from a pure sample of the target protein.

Typical protein-to-protein variation in color response is listed in Table 3. All proteins were tested at 1000µg/mL using the 30-minute/37°C Test Tube Protocol. The average net color response for BSA was normalized to 1.00 and the average net color response of the other proteins is expressed as a ratio to the response of BSA.

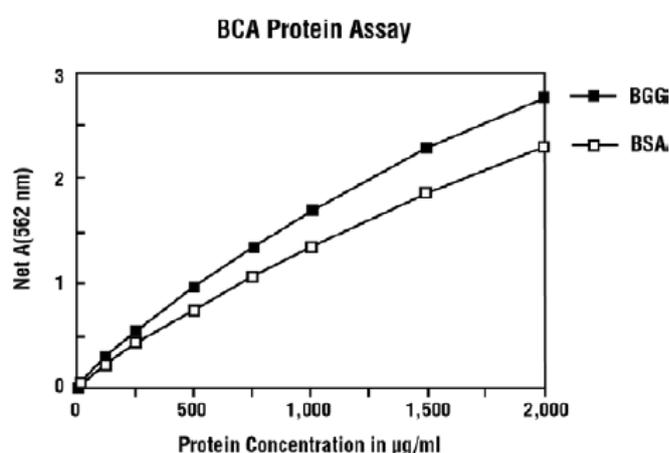


Figure 1: Typical color response curves for BSA and BGG using the Standard Test Tube Protocol (37°C/30-minute incubation).

Table 3. Protein-to-protein variation. Absorbance ratios (562nm) for proteins relative to BSA using the Standard Test Tube Protocol.

Ratio = (Avg "test" net Abs.) / (avg. BSA net Abs.)

Protein Tested	Ratio
Albumin, bovine serum	1.00
Aldolase, rabbit muscle	0.85
α-Chymotrypsinogen, bovine	1.14
Cytochrome C, horse heart	0.83
Gamma globulin, bovine	1.11
IgG, bovine	1.21
IgG, human	1.09
IgG, mouse	1.18
IgG, rabbit	1.12
IgG, sheep	1.17
Insulin, bovine pancreas	1.08
Myoglobin, horse heart	0.74
Ovalbumin	0.93
Transferrin, human	0.89
Standard Deviation	1.02
Coefficient of Variation	0.15
	14.7%

Cited References

1. Smith, P.K., *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
2. Wiechelman, K., *et al.* (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175:231-7.
3. Kessler, R. and Fanestil, D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 159:138-42.
4. Brown, R., *et al.* (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 180:136-9.

Product References

- Adilakshami, T. and Laine, R.O. (2002). Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem* 277:4147-51.
- Fischer, T., *et al.* (1999). Clathrin-coated vesicles bearing GAIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. *Proc Nat Acad Sci* 96:6722-7.
- Prozialeck, W.C., *et al.* (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequester β-catenin in human cervical epithelial cells. *Infection and Immunity* 70:2605-13.
- Roberts, K.P., *et al.* (2002). A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biology of Reproduction* 67:525-33.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS.

Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to humans or animals.

Current product instructions are available at www.thermoscientific.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Triton is a trademark of The Dow Chemical Company. Brij, Tween and Span are trademarks of Croda International PLC. Zwittergent is a trademark of Merck KGaA. All (other) trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Table 2. Compatible substance concentrations in the Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (see text for details).[§]

Substance	Compatible Concentration	Substance	Compatible Concentration
Salts/Buffers		Detergents**	
ACES, pH 7.8	25mM	Brij™-35	5.0%
Ammonium sulfate	1.5M	Brij-56, Brij-58	1.0%
Asparagine	1mM	CHAPS, CHAPSO	5.0%
Bicine, pH 8.4	20mM	Deoxycholic acid	5.0%
Bis-Tris, pH 6.5	33mM	Octyl β-glucoside	5.0%
Borate (50mM), pH 8.5 (# 28384)	undiluted	Nonidet P-40 (NP-40)	5.0%
B-PER™ Reagent (#78248)	undiluted	Octyl β-thioglucopyranoside	5.0%
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10mM	SDS	5.0%
Na-Carbonate/Na-Bicarbonate (0.2M), pH 9.4 (# 28382)	undiluted	Span™ 20	1.0%
Cesium bicarbonate	100mM	Triton™ X-100	5.0%
CHES, pH 9.0	100mM	Triton X-114, X-305, X-405	1.0%
Na-Citrate (0.6M), Na-Carbonate (0.1M), pH 9.0 (# 28388)	1:8 dilution*	Tween™-20, Tween-60, Tween-80	5.0%
Na-Citrate (0.6M), MOPS (0.1M), pH 7.5 (#28386)	1:8 dilution*	Zwittergent™ 3-14	1.0%
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	0.8mM	Chelating agents	
EPPS, pH 8.0	100mM	EDTA	10mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10mM	EGTA	-----
Glycine-HCl, pH 2.8	100mM	Sodium citrate	200mM
Guanidine-HCl	4M	Reducing & Thiol-Containing Agents	
HEPES, pH 7.5	100mM	N-acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	10mM
Imidazole, pH 7.0	50mM	Ascorbic acid	-----
MES, pH 6.1	100mM	Cysteine	-----
MES (0.1M), NaCl (0.9%), pH 4.7 (#28390)	undiluted	Dithioerythritol (DTE)	1mM
MOPS, pH 7.2	100mM	Dithiothreitol (DTT)	1mM
Modified Dulbecco's PBS, pH 7.4 (#28374)	undiluted	Glucose	10mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10mM	Melibiose	-----
PBS; Phosphate (0.1M), NaCl (0.15M), pH 7.2 (# 28372)	undiluted	2-Mercaptoethanol	0.01%
PIPES, pH 6.8	100mM	Potassium thiocyanate	3.0M
RIPA lysis buffer; 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS, pH 8.0	undiluted	Thimerosal	0.01%
Sodium acetate, pH 4.8	200mM	Misc. Reagents & Solvents	
Sodium azide	0.2%	Acetone	10%
Sodium bicarbonate	100mM	Acetonitrile	10%
Sodium chloride	1M	Aprotinin	10mg/L
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200mM	DMF, DMSO	10%
Sodium phosphate	100mM	DMSO	10%
Tricine, pH 8.0	25mM	Ethanol	10%
Triethanolamine, pH 7.8	25mM	Glycerol (Fresh)	10%
Tris	250mM	Hydrazides	-----
TBS; Tris (25mM), NaCl (0.15M), pH 7.6 (# 28376)	undiluted	Hydrides (Na ₂ BH ₄ or NaCNBH ₃)	-----
Tris (25mM), Glycine (192mM), pH 8.0 (# 28380)	1:3 dilution*	Hydrochloric Acid	100mM
		Leupeptin	10mg/L

* Diluted with ultrapure water.

** Detergents were tested using high-purity Thermo Scientific Surfact-Amps Products, which have low peroxide content.

-- Dashed-line entry indicates that the material is incompatible with the assay.

[§] For a more extensive list of substances, download Tech Tip # 68: Protein assay compatibility table from our website. This Tech Tip includes compatible substances for all of our protein assays and enables easy comparisons.

Annexe X

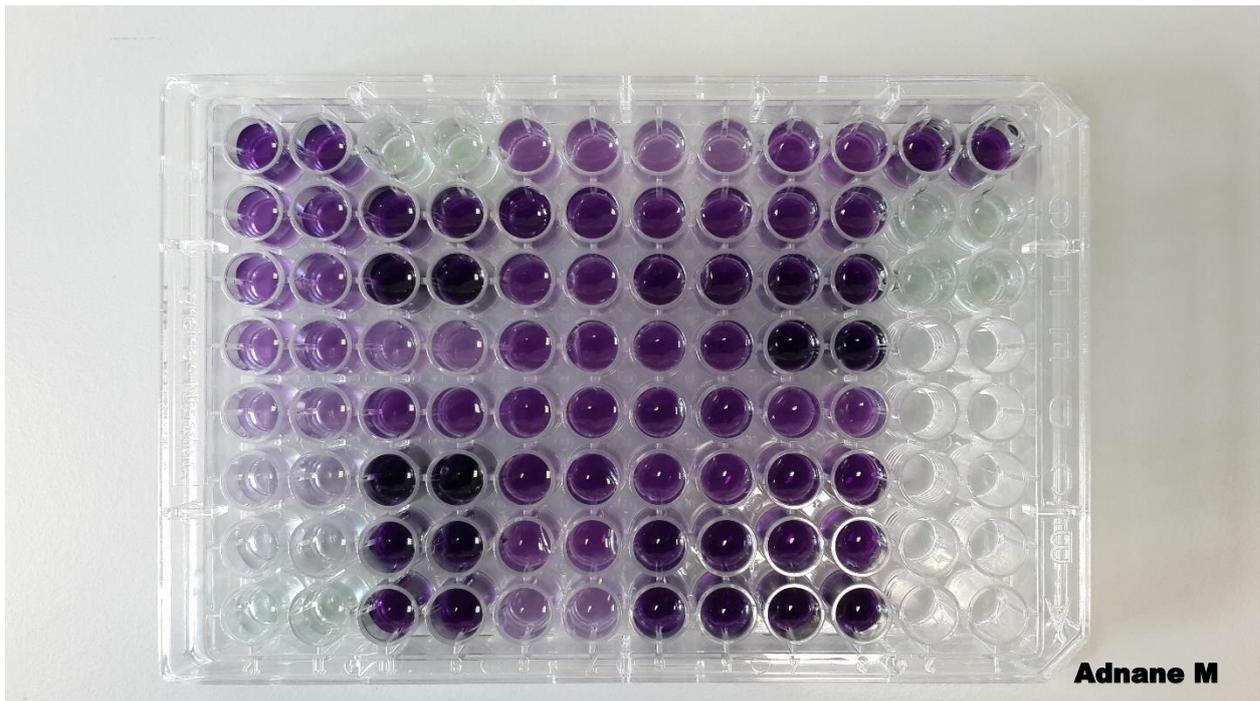


Figure 64 : Plaque de 96 trous pour le dosage de la protéine totale dans le MCV. L'analyse a été faite en double. Plus la couleur est foncée, plus le prélèvement est riche en protéine totale.

mounir:BCA Protein Assay(Absorbance)
Wednesday, June 15, 2016 3:40 PM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.038	0.067	2.654	2.582	2.338	2.225	0.517	0.515	2.524	2.348	0.132	0.140
B	0.042	0.048	1.971	1.855	2.210	2.224	1.050	0.995	2.602	2.606	0.252	0.246
C	0.049	0.073	1.877	1.868	1.272	1.257	1.651	1.657	2.666	2.657	0.380	0.374
D	0.049	0.048	1.039	1.083	1.507	1.506	1.331	1.285	1.315	1.339	0.579	0.608
E	0.054	0.053	2.704	2.693	1.451	1.307	1.224	1.250	0.609	0.583	0.858	0.846
F	0.127	0.126	2.431	2.411	2.050	2.023	1.330	1.321	2.641	2.661	0.942	1.099
G	0.120	0.129	1.710	1.593	1.488	1.530	1.639	1.960	2.208	2.139	1.384	1.286
H	2.162	2.049	1.234	1.333	0.601	0.605	0.785	0.811	0.123	0.117	1.751	1.939

OD Partial Adnane M

Figure 65 : Photos prise de l'écran du lecteur du plaque ELISA avec un programme de BCA Assay pour les protéines totales.

INSTRUCTIONS



Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit

ESS0029

2481.0

Number	Description
ESS0029	<p>Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit, pre-titered coating and detection antibodies, recommended buffers and specific assay protocol optimized for the quantitative measurement of bovine IL-6 in cell culture supernatants</p> <p>Kit provides sufficient reagents for approximately five 96-well plates, provided the Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit Protocol is followed.</p>

Kit Contents	Size	Assay Dilution
Anti-Bovine IL-6 Coating Antibody	0.625mL	1:100
Lyophilized Recombinant Bovine IL-6 Standard	5 vials	See vial label
Anti-Bovine IL-6 Detection Antibody	0.625mL	1:100
Streptavidin-HRP	0.25mL	1:400
Substrate Solution	55mL	Ready to use
Stop Solution, 0.16M Sulfuric Acid	55mL	Ready to use

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Storage: Immediately upon receipt, aliquot and freeze the coating and detecting antibodies at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in a manual defrost freezer (125 μL /tube). Avoid repeated freeze-thaw cycles. Store all other components at 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Kit is shipped on dry ice.

Table of Contents

Introduction	1
ELISA Reagent Kit Buffers	1
Additional Materials Required	1
Assay Protocol	2
Performance Characteristics	3
General References	3

Introduction

The Thermo Scientific™ Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit contains pre-titered coating and detection antibodies, recommended buffers and a specific assay protocol that have been optimized for the quantitative measurement of bovine IL-6 in cell culture supernates.

Materials Required

- 8-well strip plates, clear, corner-notched (Product No. 15031)
- Plate sealers for 96-well plates (Product No. 15036)
- Reagent reservoir, sterile, 50mL capacity, 40pk (Product No. 15075)

ELISA Reagent Kit Buffers

- D-PBS: 0.008M sodium phosphate, 0.002M potassium phosphate, 0.14M sodium chloride, 0.01M potassium chloride, pH 7.4, 0.2µm filtered (e.g., Thermo Scientific™ BupH™ Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Packs, Product No. 28374)
- Carbonate-bicarbonate Buffer: 0.2M sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.4, 0.2µm filtered (e.g., BupH Carbonate/Bicarbonate Buffer, Product No. 28382)
- Blocking Buffer: 4% BSA, 5% sucrose in D-PBS, 0.2µm filtered OR ELISA Blocker Blocking Buffer, Product No. N502
- Reagent Diluent: 4% BSA in D-PBS (pH 7.4), 0.2µm filtered
- Wash Buffer: 0.05% Tween™-20 Detergent (e.g., 0.5% Thermo Scientific™ Surfact-Amps™ 20 Detergent Solution, Product No. 28320) in D-PBS, pH 7.4 OR ELISA Wash Buffer (30X), Product No. N503

Note: Mix new solution daily.

Assay Protocol

Kit components are titrated to give optimal results using the Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit Protocol for cell culture supernatants. Any change, including component concentration, volumes, incubation times or temperatures, buffer content or number of wash steps may significantly affect the ELISA results and require optimization to give the best results.

Note: Allow all reagents and buffers to equilibrate to room temperature (22-25°C) before use. Thaw one aliquot of coating and detecting antibody for each plate. Do not use a water bath.

A. Plate Preparation

1. Dilute the Coating Antibody 1:100 in carbonate-bicarbonate buffer by adding 110µL Coating Antibody to 10.89mL of carbonate-bicarbonate buffer.
2. Add 100µL of diluted Coating Antibody to each well. Cover plate with plate sealer and incubate overnight at room temperature.
3. Aspirate Coating Antibody solution and add 300µL of Blocking Buffer to each well. Cover plate with plate sealer and incubate for 1 hour at room temperature.
4. Aspirate Blocking Buffer and proceed to assay or allow to dry overnight at room temperature. When sealed with desiccant, plates can be stored at 2-8°C for 6 months.

B. Assay Procedure

1. Reconstitute standard with Reagent Diluent with volume stated on vial label. The concentration of the reconstituted standard is 10,000pg/mL.
2. Dilute reconstituted standard 1:2 in Reagent Diluent to prepare top Standard (5000pg/mL). Using Reagent Diluent, prepare 1:2 serial dilutions of top Standard and dilute any supernatant expected to read above the top standard. Add 100µL of sample or Standard to each well. Cover plate with plate sealer and incubate for 1 hour at room temperature with moderate shaking.
3. Aspirate and wash three times with Wash Buffer using 300µL per well.
4. Dilute the Detection Antibody 1:100 in Reagent Diluent by adding 110µL of Detection Antibody to 10.89mL of Reagent Diluent.
5. Add 100µL of Detection Antibody to each well. Cover plate with plate sealer and incubate for 1 hour at room temperature with moderate shaking.
6. Aspirate and wash three times with Wash Buffer, using 300µL per well.
7. Dilute Streptavidin-HRP 1:400 in Reagent Diluent by adding 30µL of Streptavidin-HRP to 12mL of Reagent Diluent.
8. Add 100µL of diluted Streptavidin-HRP reagent to each well. Cover plate with plate sealer and incubate for 30 minutes at room temperature with moderate shaking.
9. Aspirate and wash three times with Wash Buffer, using 300µL per well.

10. Add 100µL of Substrate Solution to each well. Cover plate with plate sealer and incubate in the dark for 20 minutes at room temperature.
11. Stop the reaction by adding 100µL of Stop Solution to each well.
12. Measure the absorbance at A₄₅₀ minus A₅₅₀.

C. Absorbance Measurement

Measure absorbance on an ELISA plate reader set at 450nm and 550nm. Subtract 550nm values from 450nm values to correct for optical imperfections in the microplate. If an absorbance at 550nm is not available, measure the absorbance at 450nm only.

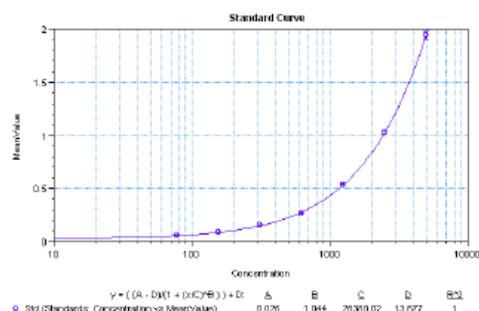
Note: When the 550nm measurement is omitted, absorbance values will be higher.

Note: Evaluate the plate within 30 minutes of stopping the reaction.

D. Calculation of Results

- The standard curve is used to determine bovine IL-6 amount in an unknown sample. Generate the standard curve by plotting the average absorbance obtained for each Standard concentration on the vertical (Y) axis vs. the corresponding bovine IL-6 concentration (pg/mL) on the horizontal (X) axis.
- Calculate results using graph paper or curve-fitting statistical software. Determine the bovine IL-6 amount in each sample by interpolating from the absorbance value (Y-axis) to Bovine IL-6 concentration (X-axis) using the standard curve.
- If the test sample was diluted, multiply the interpolated value obtained from the standard curve by the dilution factor to calculate pg/mL of bovine IL-6 in the sample.
- Absorbance values obtained for duplicates should be within 10% of the mean value. Carefully consider duplicate values that differ from the mean by greater than 10%.

Standard Curve Example



Standard curve based on data obtained using the Bovine IL-6 ELISA Reagent Kit Protocol.

NOTE: This standard curve is for demonstration only. A standard curve must be run with each assay.

Performance Characteristics

Specificity: This ELISA is specific for the measurement of natural and recombinant bovine IL-6. It does not cross-react with recombinant bovine IL-1β, IL-2, IL-4, IL-8, IFNγ, or TNFα (≤ 0.5%).

General Reference

Immunoassay: A Practical Guide. Chan and Perlstein, Eds. (1987). Academic Press: New York. p.71.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

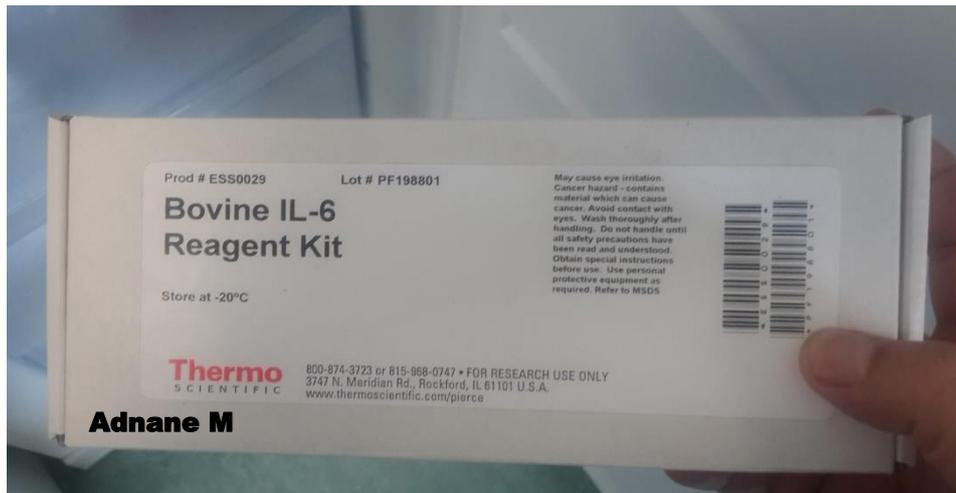
NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS.

Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to humans or animals.

Current product instructions are available at www.thermoscientific.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

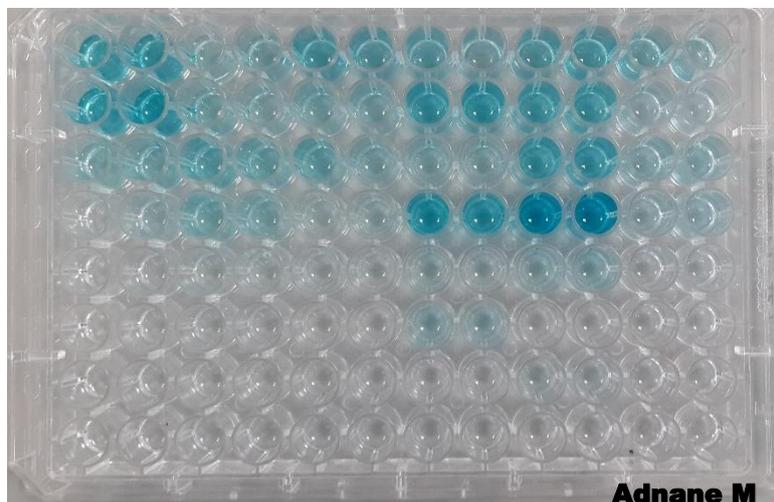
© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Tween is a trademark of Croda International PLC. All (other) trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Annexe XII



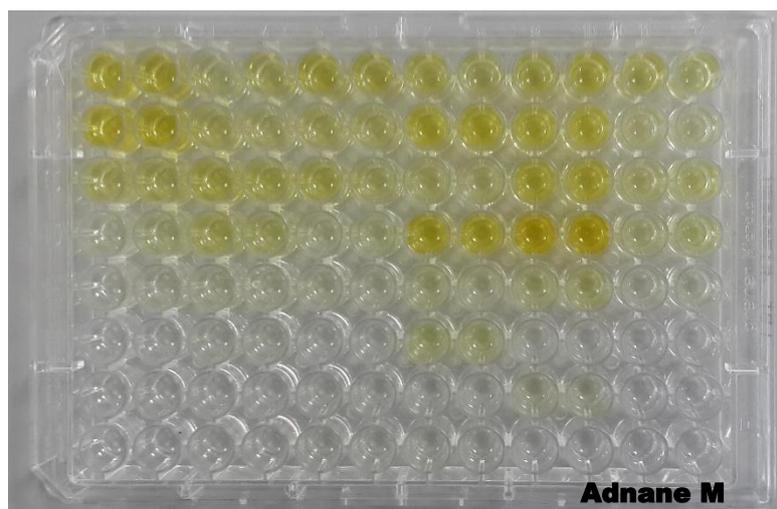
Adnane M

Figure 66 : Photo du kite ELISA pour le dosage d'IL-6 utilisé dans cette étude.



Adnane M

Figure 67 : IL-6 : Changement de couleur après addition du substrat et incubation dans l'obscurité



Adnane M

Figure 68 : IL-6 ; Changement de couleur après l'addition de la solution d'arrêt

Annexe XIII



Figure 1 : Homogénéisation du MCV après traitement avec 1mM DTT et précipitation de la phase liquide après centrifugation

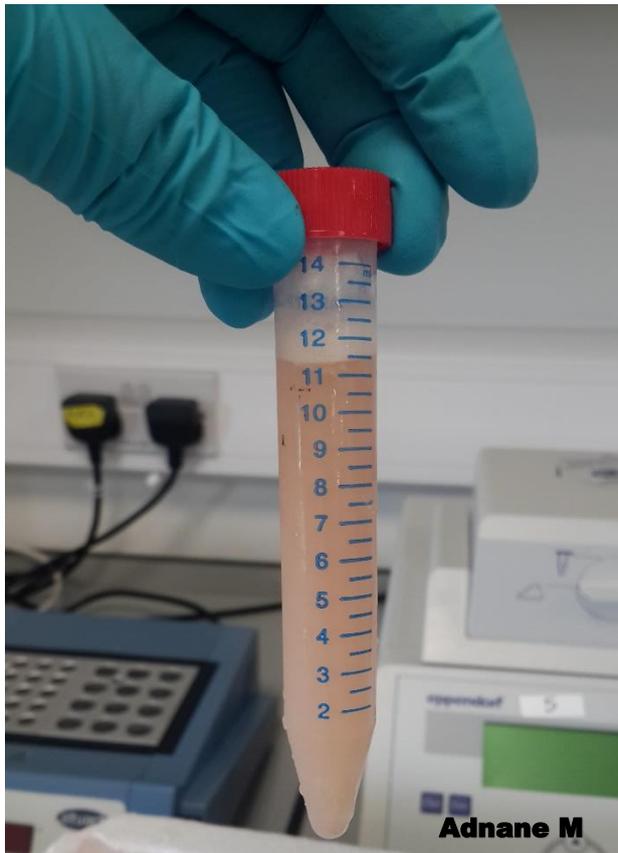
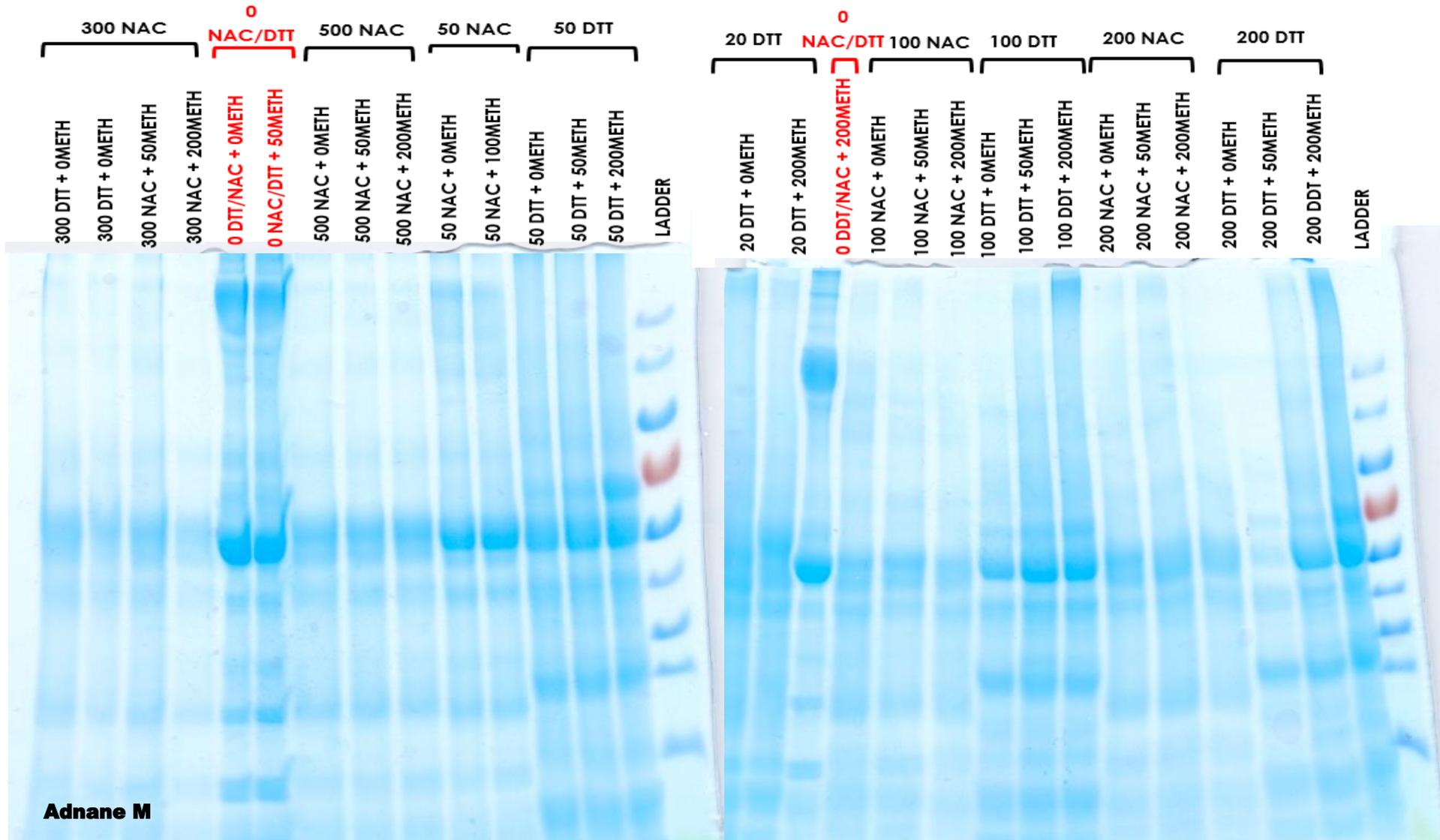


Figure 3 : Homogénéisation du MCV après traitement avec 1mM DTT



Figure 4 : Séparation de la phase solide de la phase liquide par ultracentrifugation du MCV traité par 1 mM DTT (3000 x g pendant 15 min à 4°C).

Annexe XIV



Adnane M

Figure 69 : Exemple de technique de SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) pour la séparation des protéines totales après traitement avec différents protocoles d'homogénéisations de MCV.

Annexe XV



Figure 70 : Photo du kite ELISA pour le dosage d'IL-1β utilisé dans cette étude.

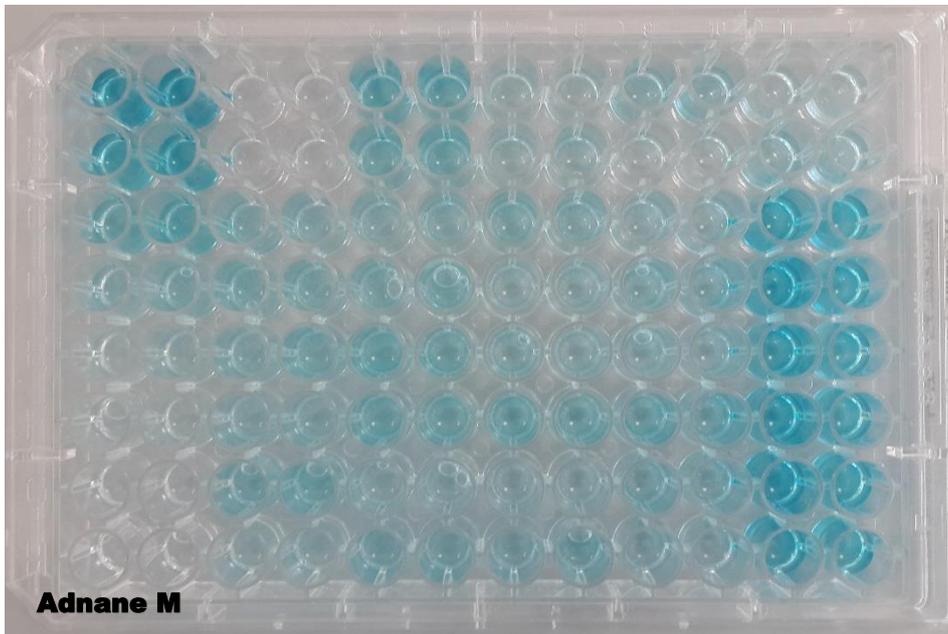


Figure 71 : IL-1β ; Changement de couleur après addition du substrat et incubation dans l'obscurité

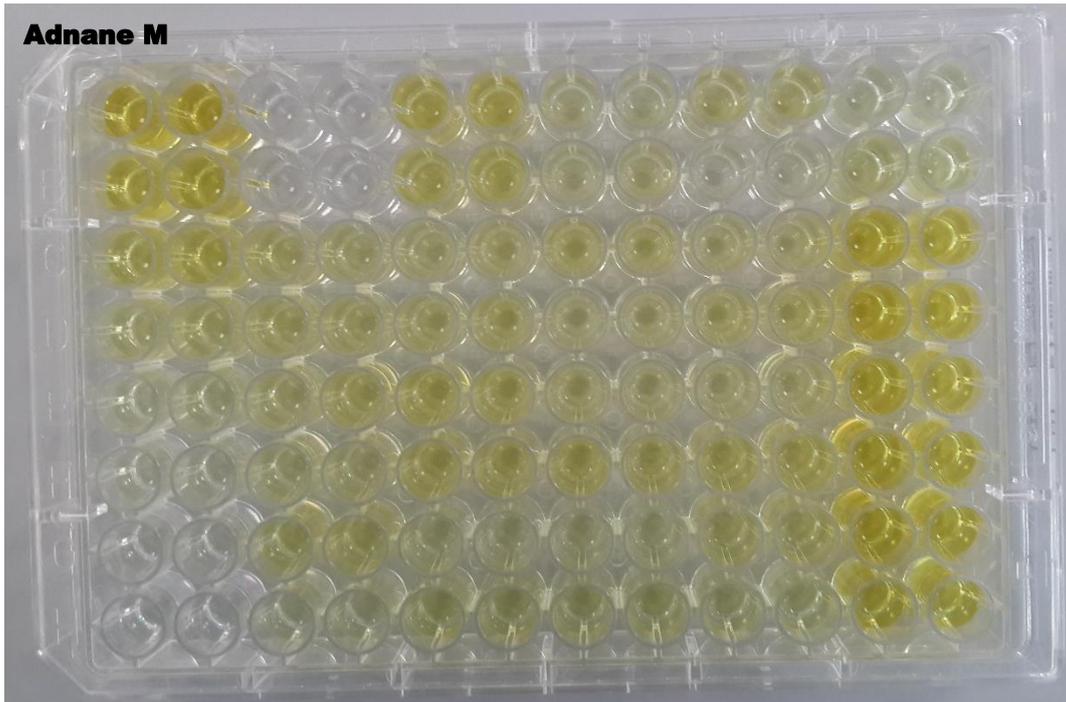


Figure 72 : IL-18 ; Changement de couleur après l'addition de la solution d'arrêt

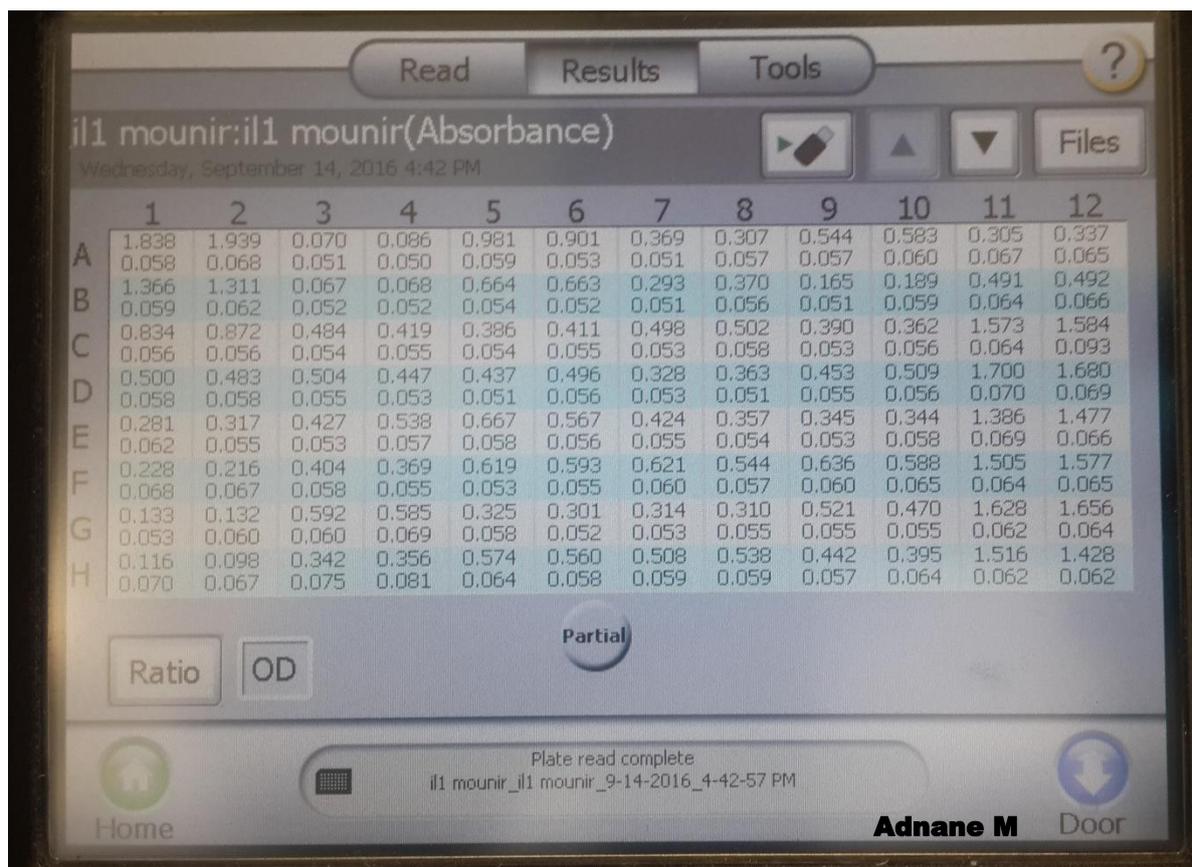


Figure 73 : Photos prise de l'écran du lecteur du plaque ELISA pour la plaque de IL-18

Annexe XVI

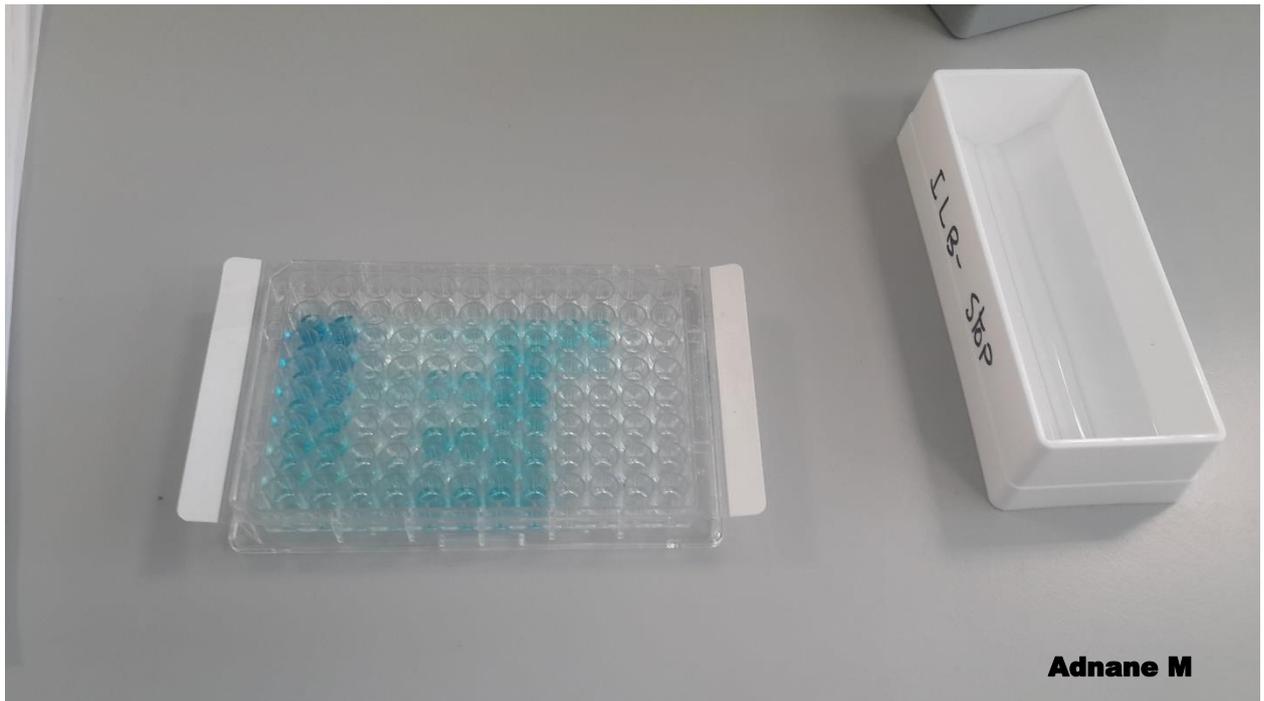


Figure 74 : Dosage d'IL-8 : Changement de couleur après addition du substrat et incubation dans l'obscurité

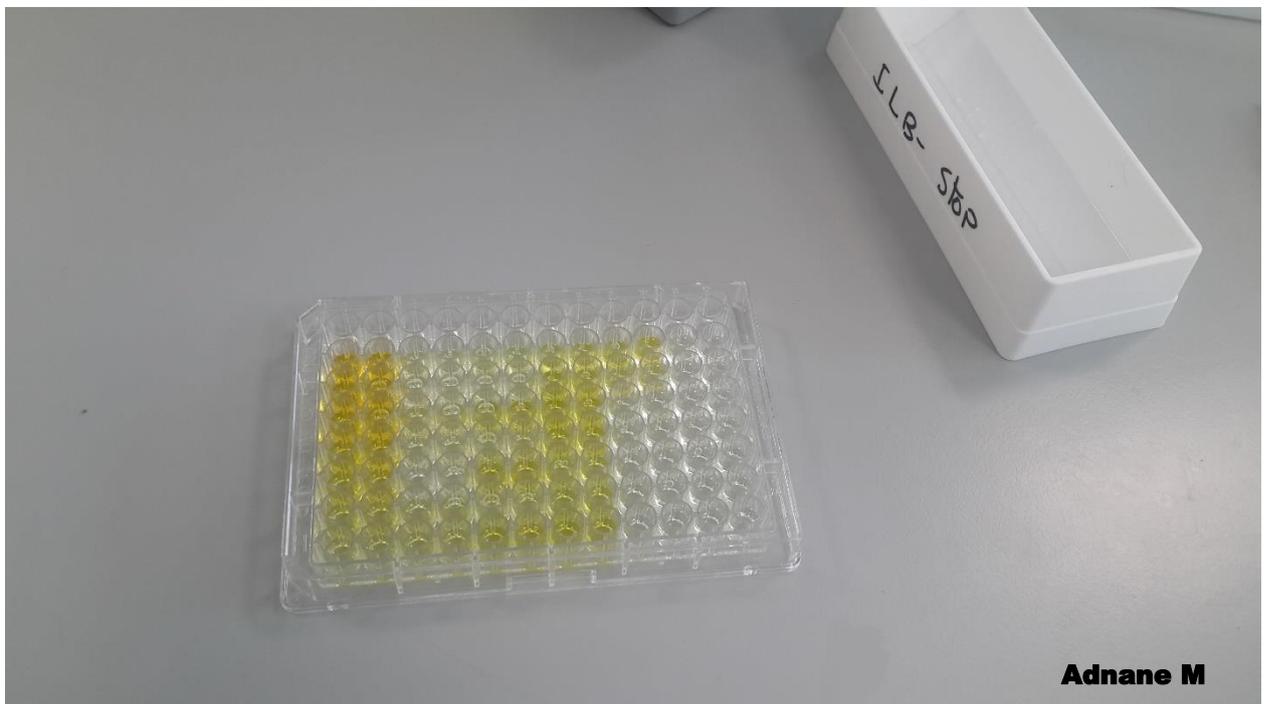


Figure 75 : IL-8 ; Changement de couleur après l'addition de la solution d'arrêt

Annexe XVII

Catalogue No: TP 802

PHASE™ RANGE

Multispecies SAA ELISA kit

96 test kit

Instructions for use



For *in vitro* research use only. Tridelta Development Ltd.

TABLE OF CONTENTS

	Page
Intended Use.....	3
Background	3
Assay Principle.....	3
Reagents Provided.....	4
Additional Materials Required.....	4
Precautions: Safety.....	5
Precautions: Procedural.....	5
Specimen Preparation.....	6
Reagent Preparation.....	7
Assay Procedure.....	9
Summary of Assay Procedure.....	10
Interpretation of results.....	11
Performance Characteristics	12
Other "Phase" APP assays available from Tridelta	14
Contact Details.....	15

For further details contact:

Tridelta Development Limited,

Unit 7, Block F,
Maynooth Business Campus,
Maynooth,
Co. Kildare,
Ireland.

Tel: +353 1 6290635
Fax: +353 1 6290687

E-mail: general@trideltaltd.com
Web page: www.trideltaltd.com

2Mt01- 06/10

Other "PHASE" acute phase assays available from Tridelta:

TP-801	Haptoglobin	Colormetric rapid test that can be used in a manual method or on a wide range of auto analysers. (Settings for some popular analysers available on request).
TP-801-Cal	Haptoglobin	Haptoglobin <i>calibrator</i> for Haptoglobin kit (TP-801).
TP-801-Con	Haptoglobin	Haptoglobin <i>controls</i> for Haptoglobin kit (TP-801).
TP-803	CRP-Canine	EIA C-reactive Protein assay specific for canine.
TP-803-Con	CRP-Canine	Canine CRP <i>controls</i> for Canine CRP EIA kits (TP-803).
TA-901	CRP-Porcine	EIA C- reactive Protein assay specific for porcine.
TP-802M	Murine SAA	EIA Serum Amyloid A assay specific for mouse.
TP-802M-Con	Murine SAA	SAA <i>controls</i> for Mouse Kit (TP-802M).
TP-807	Milk MAA	EIA Amyloid A specific for milk.
TP-802H	Human SAA	EIA Serum Amyloid A assay specific for human.
TP-802-Con	Multispecies SAA	SAA <i>controls</i> for Multi-species SAA Kit (TP-802).

Intended use

This assay is designed to detect Serum Amyloid A (SAA) in serum or plasma from a range of species. A modified version of this product can also be used to detect Amyloid A in milk (Cat number: TP 807).

Background

The Serum Amyloid A family of acute phase proteins are named because of their immunological and biochemical similarity to Amyloid A, the fibril protein in reactive systemic amyloidosis. The liver produces several different isoforms of SAA following stimulation by immune system modulators including interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor. In its native form, SAA generally consists of a 104-amino-acid polypeptide (12kd) in association with the HDL 3 subclass of plasma lipoproteins. Circulating SAA concentrations may increase up to 1000-fold following inflammation, infection, tissue injury and cell necrosis and decline rapidly following recovery.

Assay Principle

The Tridelta Phase™ range SAA kit is a solid phase sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). A monoclonal antibody specific for SAA has been coated onto the wells of the microtitre strips provided. Samples, including calibrators of known SAA content, are incubated in micro-wells at 37°C together with a HRP labelled anti-SAA antibody. Any SAA present will be captured between the coated microplate and the labelled antibody. The plate is washed after sample and antibody-HRP incubation to remove any unbound material. Following the addition of TMB, a blue product is generated the colour of which is in direct proportion to the amount of SAA present in the original sample or calibrator. The reaction is stopped with the addition of stop reagent.

Reagents Provided

1. SAA antibody coated wells 1 x 96 well plate
2. Wash buffer concentrate 1 x 50ml (20x concentrate)
3. Sample/calibrator diluent 1 x 30ml (10x concentrate)
4. SAA Calibrator 1 x freeze dried vial
5. Anti-SAA conjugate 1 x 6ml (Ready to use)
6. TMB substrate 1 x 11ml (Ready to use)
7. Stop reagent 1 x 11ml (Ready to use)

Additional materials required

1. Serum/Plasma collection equipment.
2. Microtiter plate reader capable of measurement at 450nm with reference at 630nm if available.
3. Accurate micropipettes and disposable tips to deliver 0-10 μ l, 20-200 μ l and 200-1000 μ l.
4. A repeat or multichannel pipette (50-200 μ l) for large assays.
5. Deionized or distilled H₂O.
6. Plate washer (Optional).
7. Graph paper: linear (Cartesian).
8. Glass or plastic test tubes.
9. Absorbent paper towels.
10. 96 well dust plate cover.
11. 37°C incubator.
12. Vortex.
13. Centrifuge (Optional)

Inter batch reproducibility data

One equine, porcine, bovine and canine sample was assayed in replicates (min 40 times) in three consecutive production batches to determine inter – batch precision/reproducibility for each species.

Inter batch assay reproducibility

	Equine (μ g/ml)	Porcine (μ g/ml)	Bovine (μ g/ml)	Canine (μ g/ml)
n	60	40	40	60
Mean (μ g/ml)	3.9	265.1	55.3	321.3
Standard Dev	0.33	35.6	6.7	41.7
%CV	8.5	13.4	12.1	12.9

C) Analytical Sensitivity

For serum or plasma the sensitivity will depend on the species under investigation. Sensitivities are 5.2 μ g/ml, 1.5 μ g/ml, 0.8 μ g/ml, 0.1 μ g/ml and 0.5 μ g/ml for porcine, bovine, canine, equine and feline samples respectively. These values were determined by the addition of two standard deviations of the mean OD obtained when the zero calibrator was assayed 32 times.

D) Limitations of the procedures

Serum or plasma samples are recommended for use in this test. However to eliminate potential discrepancies it is recommended that any study which starts with a particular matrix, i.e. serum or plasma, should continue to use the same matrix for the duration of the investigation.

The test can also be used to detect SAA in cell culture medium. Details are available on request from Tridelta Development Ltd.

Performance Characteristics

A) Measuring Range

For serum or plasma the measuring range will depend on the species under investigation.

Bovine: 9.4 - 150 ug/ml
Porcine: 31.25 - 500 ug/ml
Canine: 5.0 - 80 ug/ml
Feline: 3.1 - 50 ug/ml
Equine: 2.5 - 40 ug/ml

Note: These measuring ranges are calculated using the minimum recommended dilution (1:500) for each species (1:2000 for equine use).

B) Intra assay reproducibility data

One equine, porcine, bovine and canine sample was assayed in replicates (24 times) to determine intra (within) assay precision/reproducibility for each species.

Intra (within) assay reproducibility

	Equine (ug/ml)	Porcine (ug/ml)	Bovine (ug/ml)	Canine (ug/ml)
n	24	24	24	24
Mean (ug/ml)	3.76	461.14	55.2	375.9
Standard Deviation	0.172	29.2	4.2	18.9
%CV	4.6	6.3	7.5	5.0

Precautions

Safety

- For *in vitro* research purposes only.
- Some reagents contain thimerosal and may be toxic if ingested.
- Dispose of all clinical specimens, infected or potentially infectious material in accordance with good laboratory practice. All such materials should be handled and disposed of as though potentially infectious.
- Never pipette by mouth and never eat or drink at the laboratory workbench.
- Wear disposable latex gloves and eye protection where appropriate.
- The stop solution and TMB contain reagents that may irritate the skin or mucous membranes. Any reagent which comes into contact with the skin should be washed off with water immediately.
- Wash hands thoroughly when finished.

Procedural

- Do not use kit or individual reagents past their expiry date.
- Do not mix or substitute reagents from different kit lot numbers.
- Deviation from protocol provided may cause erroneous results.
- Samples should be stored refrigerated or frozen if they are not to be analysed shortly after collection. Avoid repeated freeze thaw cycles.
- When possible avoid the use of badly haemolysed or lipemic sera. If large amounts of particulate matter are present, this should be removed by centrifugation prior to assay.
- It is recommended that all calibrators and samples are run in duplicate.
- Allow all reagents to come to room temperature (20 – 25°C) and mix well before use.
- Avoid leaving reagents in direct sunlight and/or above 4°C for extended periods.
- Cover or cap all reagents when not in use.
- High quality distilled or deionised water is required for the Wash Solution and Diluent Buffer. The use of contaminated water may lead to background interference in the assay.
- Always use clean, preferably disposable, labware for all reagent preparation.
- Care must be taken not to contaminate components and always use fresh tips for each sample and component.
- Reagent delivery should be aimed at the midpoint of the side of microtitration wells, taking care not to scratch the side with the pipette tip.

- Do not allow microwells to dry out at any stage during the procedure. Never insert absorbent paper directly into the wells.
- Ensure that the bottom outer surface of the well is clean and dry before reading.
- Before commencing the assay an identification and distribution plan should be established. It is also recommended labelling each strip to enable identification.
- Read absorbances shortly after completion of the assay.
- SAA values should only be determined from the 'linear portion' of the curve.

Serum or Plasma

Specimen Preparation

Serum /Plasma

Specimens should be collected by venipuncture into serum or plasma collection tubes. Blood samples may be kept for up to 24 hours before separation of serum or plasma. However, it is best to remove serum from the clot or cells and debris from plasma or other fluids as soon as possible after collection. In general, serum or plasma may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or stored frozen at -20°C for longer periods without deterioration of SAA. Repeated freeze thaw cycles should be avoided. It is important that all refrigerated samples are brought to room temperature before use. If large amounts of particulate matter are present, this should be removed by centrifugation prior to assay.

Note: Because SAA levels can increase as much as 1000 fold during inflammation, it is recommended that the optimal dilution should be determined empirically.

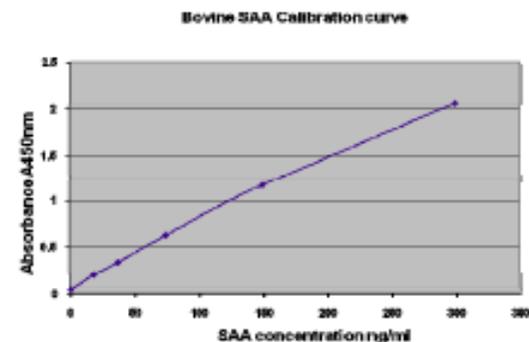
As a good starting point, all serum or plasma samples (excluding equine) should be diluted 1:500 in 1x diluent buffer (see below for preparation of this buffer) prior to assay by the addition of 10ul of sample to 5.0ml of 1x diluent buffer.

Interpretation of Test Results

1. Calculate the mean absorbance for each sample, control or standard.
2. Plot the absorbance of the standards against the calibrator concentration on semi-logarithmic or standard graph paper. (If necessary, the background absorbance for the 0ng/ml blank calibrator may be subtracted from each of the data points, including the calibrators, test samples and controls prior to plotting). Draw the best smooth curve through these points to construct the calibration curve.
3. Determine the concentrations of the test samples and controls from the calibration curve by multiplying the interpolated value by the appropriate dilution factor (eg, serum or plasma diluted 1:500 should be multiplied by 500). Samples that have a signal greater than the top calibrator or fall on the non-linear part of the curve should be further diluted in 1x diluent buffer and re-analysed.

Typical Data

An example of a typical calibration curve is represented below. This should not be used in the determination of SAA. Each user should obtain his or her data and standard curve in each experiment. A calibration curve must be run with each assay.



Summary of Assay Procedure

Summary SAA ELISA
Coated microplate: 96 well
50 µl of Anti-SAA/HRP conjugate (Ready to use) + 50 µl calibrator, control or sample (1:2000 equine and 1:500 all other species)
Incubate 1 hour at 37°C
Wash plate 4 times
100 µl TMB substrate
Incubate 15 min at room temperature in the dark
100 µl stop solution (Do NOT wash)
Read absorbance at 450 nm

10

For all equine serum or plasma samples, a good starting dilution should be 1:2000 in 1x diluent buffer prior to assay. Dilute the equine sample 1:10 initially by adding 10ul of sample to 90ul of 1x diluent buffer ('intermediate sample' dilution). To achieve a final 1:2000 dilution, add 10ul of this 'intermediate sample' to 2ml of 1x diluent buffer.

Reagent Preparation

1x Sample/calibrator diluent (1x diluent buffer, BLUE)

Dilute 1 volume of sample/calibrator diluent concentrate (10x) with 9 volumes of distilled water. Prepared reagent (1x diluent buffer) is stable for one day at room temperature.

1x Wash buffer (RED)

Dilute 1 volume of wash buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store both the wash buffer concentrate and working wash buffer (1x) in the refrigerator. Diluted wash solution is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

NOTE: Ensure that any crystals that may have developed in the diluent have been completely dissolved prior to dilution for use. This may be accomplished by incubation of the bottle at 37°C for several minutes.

Dilution of SAA calibrators

Note: The calibration curve should be prepared after all samples and controls have been diluted and immediately before plate loading.

1. Label 6 tubes C1-C6. Add 150ul of 1x diluent buffer to the 5 tubes labelled C2-C6 respectively, where tube C5 represents the lowest calibrator with SAA and C6 is the zero calibrator or assay blank. (Diluent buffer only).
2. To prepare the top calibrator, reconstitute the SAA calibrator provided in the kit by adding 1ml of 1x diluent buffer to the vial. Vortex vigorously to dissolve completely.

7

3. Add 300ul of the top calibrator to the first tube labelled C1. Immediately aliquot (320ul per aliquot) the remaining top calibrator and freeze at -20°C .
4. Add 150ul of the top calibrator (C1) to tube C2. Mix well and serially dilute down to complete the range as directed in Table 1.
5. Discard all diluted calibrators immediately after use and prepare a new range as required for future assays from the frozen stock calibrator – as described above.

Table 1: Preparation of Working Calibration Curve

Tube Number	Volume of stock calibrator (ul)	Volume of 1x diluent buffer(ul)	Serial Dilution (ul)
C1	300	--	---
C2	-	150	150 of C1
C3	-	150	150 of C2
C4	-	150	150 of C3
C5	-	150	150 of C4
C6	-	150	-

Table 2: Concentration of calibrators for Serum or Plasma

Standards	Bovine (ng/ml)	Porcine (ng/ml)	Canine (ng/ml)	Feline (ng/ml)	Equine (ng/ml)
C1	300	1000	160	100	20
C2	150	500	80	50	10
C3	75	250	40	25	5
C4	37.5	125	20	12.5	2.5
C5	18.8	62.5	10	6.25	1.25
C6	0	0	0	0	0

Assay Procedure

Allow test reagents and samples to reach room temperature before use.

1. Prepare appropriate volumes of assay reagents as described above under 'reagent preparation'.
2. Ensure the serum or plasma samples are homogenous before use. Dilute serum and plasma samples 1:500 (equine samples 1:2000) in 1x diluent buffer. If large amounts of particulate matter are present, this should be removed by centrifugation prior to assay.
3. Prepare the calibration curve as outlined in table 1 above.
4. Determine the number of 8-well strips needed for the assay. Re-bag extra strips, seal bag and store in a refrigerator.
5. Add 50µl of Anti-SAA/HRP (yellow) conjugate to each well.
6. Add 50µl, in duplicate, of diluted calibrator, control or sample to each well. Tap sides of the plate gently to mix.
7. Cover the plate with a dust cover. Incubate the plate for 1 hour at 37°C .
8. After incubation aspirate or decant and wash the plate four times with diluted wash buffer. After the last wash, tap the plate dry on absorbent paper.
9. Add 100µl of TMB substrate
10. Cover the plate and incubate at room temperature for 15 minutes.
11. Add 100µl of stop solution and tap gently to mix.
12. Read the absorbance of each well at 450nm using 630nm as a reference, if available.

PHASE™ RANGE**Haptoglobin Assay****Intended use**

The activation of the body's immune system-mediated defence mechanisms is termed the acute phase response. This system is activated due to infections, inflammation, tissue injury, neoplastic growth or immunological disorders. The Haptoglobin assay is designed to detect the acute phase protein, in serum from a range of animal species. It can also be used as an indicator of red blood cell haemolysis.

Assay principle

Free haemoglobin exhibits peroxidase activity, which is inhibited at low pH. Haptoglobin present in the specimen combines with haemoglobin and at low pH preserves the peroxidase activity of the bound haemoglobin. Preservation of the peroxidase activity of haemoglobin is directly proportional to the amount of haptoglobin present in the specimen. This assay can be performed in manual or automated formats.

Introduction

Haptoglobin is one of a series of acute phase proteins that is found in the blood of both humans and animals. Under normal conditions, it is either absent from the blood or present at very low levels, dependent on the species, ranging from less than 0.05 mg/ml in cattle to 1-3 mg/ml in humans. However, haptoglobin can increase significantly in response to acute infection, inflammation or trauma. The rise in serum haptoglobin and the continuous monitoring of this during the acute phase response gives valuable information to the clinician in both human and veterinary medicine. Conversely, decreased haptoglobin is used as a marker to indicate the extent of haemolysis. Decreases in haptoglobin levels are observed if free haemoglobin is present in the blood arising from haemolysis of the red blood cells. Free haemoglobin binds to haptoglobin with subsequent removal of the complex by the liver.

Note: This product is for research purposes only.

Components

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Haemoglobin | 1 x 12ml stabilised Haemoglobin. |
| 2. Haemoglobin diluent | 1 x 12ml Haemoglobin diluent. |
| 3. Calibrator | 1 x 0.5ml Haptoglobin Calibrator (2mg/ml). |
| 4. Chromogen | 1 x 11ml Chromogen reagent. |
| 5. Substrate | 1 x 8ml Substrate containing stabilised hydrogen peroxide. |
| 6. Sample/Calibrator Diluent | 1 x 12ml Phosphate Buffered Saline (PBS). |

Additional materials required

1. Serum collection equipment.
2. Automated analyser ($A_{600\text{nm}}$) or Microplate reader ($A_{630\text{nm}}$).
3. Accurate micropipettes and disposable tips to deliver 0-10 and 100 μl .
4. Test tubes and plastic pipettes (5-10ml).
5. Timer.
6. 96 well microtitre plate or strips.

Storage and Stability

The kit components are stable when stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the label.

Safety

- Never pipette by mouth and wear disposable latex gloves and eye protection where appropriate.
- The Haemoglobin Diluent, Chromogen and Substrate contain reagents that may irritate the skin or mucous membranes. Any reagent, which comes in contact with skin, should be washed off with water immediately.

Sample and Reagent Preparation

Samples

Samples should be collected by venipuncture into serum collection tubes and can be stored for up to 24 hours at 2-8°C. For longer periods, storage at -20°C is recommended where samples are not for immediate assay. If specimens have levels of haptoglobin greater than the top standard, they should be diluted 1/5 in the Sample/Calibrator Diluent and retested.

Haemoglobin

Accurately premix equal volumes of Haemoglobin and Haemoglobin Diluent prior to commencement of assay (**Reagent 1**). Prepared reagent is stable for 2 weeks when stored at room temperature (20-25°C). Long term storage at 4°C is also recommended.

Chromogen /Substrate

Note: This assay can be run in either two or three reagent format. For manual procedure, it is recommended to use the two-reagent format as outlined below.

Accurately premix Chromogen and Substrate in a ratio of 9:5 prior to commencement of assay (**Reagent 2**). Refer to the table below for suggested volumes.

Number of Tests	Volume of Chromogen	Volume of Substrate
10	0.9 ml	0.5 ml
20	1.8 ml	1.0 ml
40	3.6 ml	2.0 ml
80	7.2 ml	4.0 ml

Reagent 2 is stable for up to 8 hours at room temperature and can be stored for up to 24 hours at 4°C in a closed container.

Calibrator (Microplate Method)

Label five tubes with numbers C1-C5, corresponding to haptoglobin standards 2, 1, 0.5, 0.25 and 0 mg / ml respectively. Calibrators for manual test format are prepared by following the steps provided in the table:

Tube No.	Volume Calibrator	Volume Diluent	Tube Concentration
C1	50 µl of stock	-	2.0 mg/ml
C2	50 µl of stock	50 µl	1.0 mg/ml
C3	50 µl C2	50 µl	0.5 mg/ml
C4	50 µl C3	50 µl	0.25 mg/ml
C5	-	50 µl	0 mg/ml

Prepared calibrators are stable for 8 hours when stored at room temperature (20-25°C).

Calibrator (Automated Methods)

For automated procedures single point calibration may be used by dilution of the 2.0mg/ml standard 1:1 to give a 1mg/ml calibrator. Alternatively, use only 0, 0.5 and 2.0mg/ml calibrator. (Haptoglobin standard of 0.5mg/ml can be prepared by adding 50ul of 2mg/ml standard to 150ul of calibrator diluent). Multi-point calibration curves can also be used.

Test Temperature

The test can be performed at 25°C, 30°C or 37°C. Normal ranges for a variety of species are provided and were determined at 37°C. *However, each laboratory should establish their own normal range for each species being tested.*

Procedure

1. Manual method (microplate or spectrophotometric).

Note: Addition of diluted Haemoglobin (Reagent 1) and the Chromogen / Substrate solution (Reagent 2) should be made with a multi-channel or repeating pipette.

1. Transfer **7.5µl** of each prepared calibrator (0-2mg/ml) along with test specimens, in duplicate, to the blank microplate.
2. Add **100µl** of Reagent 1 to each microwell. Tap the microplate gently to ensure mixing of calibrators/specimens and haemoglobin.
3. Add **140µl** Reagent 2 to each microwell. Incubate for **5 minutes** at room temperature (20-25°C).
4. Read **immediately** at 630nm.
5. Generate a calibration curve by plotting Absorbance (630nm) versus Haptoglobin concentration (mg/ml) to facilitate calculation of Haptoglobin concentration in test specimens. Specimen values should be read directly from the curve. Multiply observed value by appropriate factor if specimen dilution was necessary.

Automated Method (3 reagent procedure)

Note: Instrument protocols can be found on the Tridelta Development Ltd Web page, (www.trideltaltd.com) or by contacting the company directly.

1. Dispense the required amount of Reagent 1 (premixed Haemoglobin), the Chromogen and the Substrate into separate storage vessels on the instrument.
2. Aliquot the required volume of Calibrators and Samples into suitable vessels.

Automated Method (2 reagent procedure).

1. Dispense the required amount of Reagent 1 and Reagent 2 into the appropriate storage vessels on the instrument.
2. Aliquot the required volume of sample, controls and calibrator into the appropriate sample cups.

Expected Ranges

SPECIES	NORMAL RANGE (mg/ml)	ACUTE RANGE (mg/ml)
Bovine	0.0-0.05	0.1-3.0
Canine	0.3-3.5	4.0-9.0
Rodent	0.25-0.51	0.8-1.8
Murine	0.0-0.1	0.3-2.0
Feline	0.7-2.0.	3.0-10.0
Human	1.0-3.0.	4.3-7.8
Porcine *	0.0-2.2	3.0-8.0

* Provisional results

Note: All ranges were determined on a COBAS MIRA at 37°C. Laboratories should establish their own normal range, which may vary depending on the species selected for study (e.g. Sprague Dawley V's Wistar rodents).

Performance Characteristics

Note: performance characteristics were determined on a Cobas Mira.

Intra assay Variation

(n=10)	Mean Hp Concentration (mg/ml)	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
Low	0.23	0.003	1.36
Medium	0.97	0.009	0.09
High	2.04	0.02	0.89

Inter assay Variation

(n=10)	Mean Hp Concentration (mg/ml)	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
Low	0.26	0.03	11
Medium	1.11	0.08	6.9

Sensitivity

Sensitivity has been determined as 0.05 mg/ml Haptoglobin.

Limitations of Test

Plasma and haemolysed samples should not be used in the test. The presence of free haemoglobin will interfere with the detection of target analyte.

Other “PHASE” acute phase assays available from Tridelta:

<i>TP-803</i>	<i>CRP-Canine</i>	<i>EIA C-reactive Protein assay specific for canine.</i>
<i>TA-901</i>	<i>CRP-Porcine</i>	<i>EIA C-reactive Protein assay specific for porcine.</i>
<i>TP-802</i>	<i>SAA</i>	<i>Multi-species, colormetric, immunoassay.</i>
<i>TP-802M</i>	<i>SAA mouse</i>	<i>EIA Serum Amyloid A assay specific for mouse</i>
<i>CON1</i>	<i>SAA mouse</i>	<i>Freeze-dried control for Murine SAA EIA.</i>

For further details on any of our products, please contact Tridelta directly or visit our web site.

For further details contact:

Technical Information:

Tridelta Development Limited
National University of Ireland
South Campus
Maynooth
Co. Kildare

Tel: +353 1 6290635
Fax: +353 1 6290687

Marketing and Sales:

Tridelta Development Limited
48 Main Street
Bray
Co. Wicklow

Tel: +353 1 2765105
Fax: +353 1 2765106

E-mail: general@trideltaltd.com
Web page: www.trideltaltd.com

Haptoglobin Kit. (Cat No: TP801)

The reagents are bottled and ready for packaging. They are for *'in-vitro'* research use only. Not for use in diagnostic procedures.

1. **Haemoglobin 12ml** contains stabilised Haemoglobin in buffered saline with preservatives (0.1 mg/ml Gentamycin, 2.5ug/ml Amphotericin B)

2. **Haemoglobin diluent 12ml** contains dilute Guanidine HCl in distilled water.

3. **Calibrator 0.5ml** contains semi-purified haptoglobin material with preservatives (0.1 mg/ml Gentamycin, 2.5ug/ml Amphotericin B).

4. **Chromogen 11ml** contains citric acid buffered chromogen with preservative (0.01%Thimerosal).

5. **Substrate 8ml** contains stabilised hydrogen peroxide (0.12%) in distilled water with preservative (0.01%Thimerosal).

6. **Sample/Calibrator Diluent 12ml** contains Phosphate Buffered Saline (PBS) with preservatives (0.01 % Thimerosal)

Note: all the above reagents are non-infectious and non-hazardous and are manufactured on site in Tridelta Development Ltd - Ireland.

All reagents should be stored at 4⁰C.

Annexe XIX

Bovine Complement Component 5B (C5B) ELISA Kit

Cat.No: MBS008530

Store All Reagents At 2°C-8°C !

Package Size: 48T/Kit or 96T/Kit

Valid Period: Six Months (2°C-8°C)

IN VITRO RESEARCH USE ONLY!

NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

1. Introductions

This **Quantitative Sandwich ELISA** kit is only for in vitro research use only, not for drug, household, therapeutic or diagnostic applications! This kit is intended to be used for determination the level of C5B (hereafter termed "analyte") in **undiluted original Bovine body fluids, tissue homogenates, secretions or feces samples**. This kit is **NOT** suitable for assaying non-biological sources of substances.

2. Performances

Sensitivity: The sensitivity of this kit is 2.0 ng/ml.

Detection Range: The detection range of this kit is 15.6 ng/ml - 500 ng/ml.

Specificity: No significant cross-reactivity or interference between this analyte and analogues is observed.

Reproducibility: Both Intra-assay CV (%) and Inter-assay CV (%) is less than 15%. [CV(%) = SD/mean × 100].

3. Materials Supplied

Items	Materials	48 Tests	96 Tests
1	Microelisa Stripplate	12×4 Strips	12×8 Strips
2	Standards×6 vials	0.5ml×6 vials	0.5ml×6 vials
3	Sample Diluent	3.0ml	6.0ml
4	HRP-Conjugate Reagent	5.0ml	10.0ml
5	20× Wash Solution	15ml	25ml
6	Stop Solution	3.0ml	6.0ml
7	Chromogen Solution A	3.0ml	6.0ml
8	Chromogen Solution B	3.0ml	6.0ml
9	Closure Plate Membrane	2	2
10	Sealed Bags	1	1
11	Instruction	1	1

Note: The concentration gradients of Standards from S_{VI} to S_I are followed by: 500,250,125,62.5,31.2,15.6 ng/ml.

4. Materials Required but Not Supplied

4.1) Distilled or deionized water.

4.2) Absorbent papers or paper towels.

4.3) Pipettes and disposable pipette tips.

4.4) An ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm.

4.5) A constant temperature incubator which can provide stable incubation conditions up to 37°C±0.5°C.

5. Precautions

5.1) Limited by current skill and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between this analyte and all its analogues, therefore, cross reaction may still exist in other species or materials.

5.2) Influenced by the factors including cell viability, cell number and also sampling time, samples from cell culture supernatant are **NOT** suitable for detected by this kit.

5.3) The reagents and the plate of this kit and its technical design parameters are only matched and designed for optimal performance for the undiluted original samples in this assay, and owing to the possibility of mismatching between antigen/antibody from other manufacturers and antibody/antigen that are used in this kit (such as difference in conformational epitope caused by chemical environment or difference in linear epitope, and so on), proteins extracted or recombinant proteins are **NOT** suitable for detected by this kit, and please do **NOT** substitute reagents from one kit to other kit and use only the reagents supplied by manufacturer, and moreover, we will **NOT** responsibility for using this kit or part of this kit to do any other experiments (such as western blot, immunohistochemistry, spike/recovery and so on) arbitrarily.

5.4) Each kit has been strictly passed Q.C test. However, results from end users might be inconsistent with our in house data due to some unexpected transportation or storage conditions, or different ambient temperature, lab equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age. Assay variance among wells or kits might arise from these factors, too.

5.5) Kits from different manufacturers with the same item might produce different results, since different manufacturers can use different antigens or antibodies, and production processes.

5.6) The Stop Solution suggested for use of this kit is an acid solution, so please pay enough attention to safety when use it. Serum and plasma should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease. Disposable gloves must be worn during the assay procedure, since no known test method can offer complete assurance that products derived from blood will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious and good laboratory practices should be followed.

6. Samples Collection and Storage

6.1) **Serum** - Centrifuge serum for approximately 20 minutes at $1000 \times g$ (or 3000 rpm) within 30 minutes after collection. Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.2) **Plasma** - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for approximately 20 minutes at $1000 \times g$ (or 3000 rpm) within 30 minutes after collection. Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.3) **Blood** - Collect blood using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for approximately 15 minutes at $1500 \times g$ (or 5000 rpm) within 30 minutes after collection. Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.4) **Other Body Fluids (Lymph Fluid and Cerebrospinal Fluid)** - Centrifuge samples for approximately 20 minutes at $1000 \times g$ (or 3000 rpm) within 30 minutes after collection. Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.5) **Tissue homogenates** - The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type. Remove excess blood and weighed before homogenization. Minced the tissues to small pieces and homogenized them in a certain amount of PBS (Usually 10mg tissue to 100 μl PBS.). After that, centrifugate homogenates for approximately 15 minutes at $1500 \times g$ (or 5000 rpm). Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.6) **Secretions (Saliva, Urine, Synovial Fluid and so on)** - Centrifuge samples for approximately 20 minutes at $1000 \times g$ (or 3000 rpm) within 30 minutes after collection. Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.7) **Feces** - Collect and fully shaking samples in a certain amount of PBS (Usually 10mg tissue to 100 μl PBS.). After that, centrifugate homogenates for approximately 20 minutes at $1500 \times g$ (or 5000 rpm). Collect the supernatants carefully, assay immediately or store samples at -20°C or -80°C . Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.8) Important Notes:

6.8.1) Although we have listed most of possible samples, but it does **NOT** mean the analyte exists in all of these listed samples, because some analytes only exist in some specific organelles, cells or tissues.

6.8.2) We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please make sure that sufficient samples are available.

6.8.3) Fresh samples without long time storage are recommended for assay. Otherwise, protein degradation and denaturalization may occur in those samples and finally lead to wrong results. Samples to be used within 5 days may be stored at $2-8^{\circ}\text{C}$, otherwise samples must be stored at -20°C (\leq one month) or -80°C (\leq two months) to avoid loss of bioactivity and contamination. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

6.8.4) Grossly hemolyzed samples are not suitable for use in this assay, so the samples should be centrifuged adequately and no hemolysis or granule was allowed.

6.8.5) The kit can not assay the samples which contain sodium azide (NaN₃), because NaN₃ will inhibit the activity of horseradish peroxidase (HRP).

6.8.6) If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of this kit is necessary.

7. Reagent Preparation and Storage

Please store the plate and all reagents at 2°C-8°C.

7.1) The valid period of this kit is six months at 2°C-8°C. The kit should not be used beyond the expiration date.

7.2) Wash Solution (1×) - Dilute one volume of Wash Solution (20×) with nineteen volumes of deionized or distilled water. Diluted Wash Solution is stable for one month at 2°C-8°C. Undiluted Wash Solution and other reagents are stable for six months at 2°C-8°C.

7.3) When the kit is opened, please used up all Microelisa Stripplate as soon as possible after removed the plate from the foil pouch. The Microelisa Stripplate is detachable, so please return the unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal along entire edge of zip-seal for preventing damp. The remaining reagents still need to be stored at 2°C-8°C.

8. Assay Procedures

Please check all reagents and equipments before the experiments and make sure everything is right and OK!

Please do the experiments strictly to follow the assay procedures and DO NOT change any assay procedures arbitrarily!

8.1) Bring all reagents and samples to room temperature (18°C-25°C) naturally for 30min before starting assay procedures. **DO NOT** use hot water baths to thaw samples or reagents. If necessary, doing a low - speed centrifugation for one or two seconds to concentrate the Standards to the bottom of the vials. The Microelisa Stripplate is detachable, detach unused strips from the plate frame, return them to the foil pouch with the desiccant pack, and reseal for preventing damp.

8.2) Set Standard wells, Sample wells and Blank/Control wells, add Standard 50µl to each Standard well, add Sample 50µl to each Sample well, add Sample Diluent 50µl to each Blank/Control well. It is recommended that all Standards, samples and Sample Diluent be added in duplicate to the plate.

8.3) Add 100µl of HRP-conjugate reagent to **each well**, cover with a Closure Plate Membrane and incubate for 60 minutes at 37°C.

8.4) Wash the plate 4 times.

8.4.1) **Manual Washing** – Dump the incubation mixtures of the wells into a sink or proper waste container. Using pipette or squirt bottle, fill each well completely with Wash Solution (1×), after about one minute's standing, invert and hit the plate onto absorbent papers or paper towels until no moisture appears. Repeat this procedure four times. **Note:** Hold the sides of the plate frame firmly when washing the plate to assure that all strips remain securely in frame.

8.4.2) **Automated Washing** - Aspirate all wells, then wash plates four times using Wash Buffer (1×). Always adjust your washer to aspirate as much liquid as possible and set fill volume at 350µl/well/wash. After final wash, invert plate, and blot dry by hitting plate onto absorbent paper or paper towels until no moisture appears.

8.5) Add Chromogen Solution A 50µl and Chromogen Solution B 50µl to **each well** successively. Then **protect from light** to incubate for 15 minutes at 37°C.

8.6) Add 50µl Stop Solution to **each well**. The color in the wells should change from blue to yellow.

8.7) Read the Optical Density (O.D.) at 450 nm using an ELISA reader **within** 15 minutes after adding Stop Solution (Around 5 minutes is the best time.).

8.8) Important Notes::

8.8.1) Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism.

8.8.2) Do not remove the plate from the foil pouch until needed. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results.

8.8.3) The concentration gradients of Standards of this kit have already covered far more than the range of concentration of this analyte in undiluted original samples, so please **DO NOT** use the diluted or non-original samples when using our kits, please assay the undiluted original samples directly, otherwise samples that prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected results or contaminated, and moreover, the level of this analyte that has been diluted may out of the detection range of the kits.

8.8.4) The Sample Diluent are more than PBS, it also contains a little stabilizer and preservative. It is made well as a Blank/Control reagent (adjusted zero value) for the experiment, because the Standards also contain a little stabilizer and preservative, so **DO NOT** use your own PBS or other reagents as a Blank/Control reagent, even if you have used it to collect your samples.

8.8.5) Samples or Reagents Addition: Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. **DO NOT** touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and samples, although not required, is recommended. To avoid contamination, please use fresh disposable pipette tips for each transfer.

8.8.6) Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. **DO NOT** allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, **DO NOT** let the strips **DRY** at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed. **DO NOT** shake when incubation, because it will affect the binding reaction of antigen and antibody if not shaking equally.

8.8.7) Washing Plate: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading.

8.8.8) Controlling of Reaction Time: Observe the change of color after adding Substrates (e.g. observation once every 10 minutes). Substrates should change from colorless or light blue to gradations of blue. The color developed in the wells will turn from blue to yellow after added the Stop Solution. If the color turns green, it indicate the Stop Solution has not mixed thoroughly.

8.8.9) Chromogen Solution B is easily contaminated, it should remain colorless or light blue until added to the plate, please protect it from light.

9. Calculation of Results

9.1) Average the duplicate readings for each standard and sample to subtract average optical density of the Blank/Control (V_{BC}).

Standards (concentration):	0	S_I	S_{II}	S_{III}	S_{IV}	S_V	S_{VI}
Mean O.D.(450nm):	V_{BC}	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6
Adjusted:	0	$V_1 - V_{BC}$	$V_2 - V_{BC}$	$V_3 - V_{BC}$	$V_4 - V_{BC}$	$V_5 - V_{BC}$	$V_6 - V_{BC}$

9.2) Using the professional curve fitting software to make a standard curve (usually most of the curves are linear, and a few curves are quadratic or cubic) and calculate the level of this analyte.

9.3) **Note:** Any variation in ambient temperature, equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age can cause variation in result. Each user should obtain his own standard curve.