



Open Archive Toulouse Archive Ouverte

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

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/21299>

To cite this version:

Houpin, Emilie. *Evaluation expérimentale de la réponse endométriale à l'infection par escherichia coli des brebis sélectionnées pour la résistance aux mammites*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 122 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

EVALUATION EXPERIMENTALE DE LA REPONSE ENDOMETRIALE A L'INFECTION PAR *ESCHERICHIA COLI* CHEZ DES BREBIS SELECTIONNEES POUR LA RESISTANCE AUX MAMMITES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

HOUPIN Emilie
Née, le 29 Juin 1993 à NICE (06)

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Olivier PARANT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles FOUCRAS
Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS 1° CLASSE

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

PROFESSEURS 2° CLASSE

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

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Olivier PARANT

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

Gynécologie Obstétrique

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

Veillez trouver ici l'expression de nos respectueux hommages.

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Pathologie des ruminants

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce projet et nous a soutenu tout au long de

l'élaboration de ce travail,

Veillez accepter nos sincères remerciements et l'expression de notre profond respect.

A Madame la Professeure Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Pathologie de la reproduction

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

Nos plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Hervé CASSARD

Ingénieur de Recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A Monsieur Christophe RICHARD

Assistant Ingénieur de l'Institut National de la Recherche Agronomique

Pour leur expertise technique qui a permis la réalisation de cet essai,

A Messieurs Olivier SANDRA et Pierre GERMON

Chercheurs de l'Institut National de la Recherche Agronomique

A tous ceux que j'aime...

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
TABLEAUX	15
LISTE DES ANNEXES	16
INTRODUCTION	20
CHAPITRE I	22
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
I. DESCRIPTION MEDICALE DE L'ENDOMETRITE	23
A. ANATOMIE DE L'UTERUS OVIN	23
B. HISTOLOGIE DE LA PAROI UTERINE.....	23
C. ENDOMETRITE : DEFINITIONS ET DESCRIPTION CLINIQUE	26
1. <i>Définition histopathologique</i>	26
2. <i>Définitions médicales</i>	27
a) Endomérite clinique	27
b) Endomérite subclinique.....	27
3. <i>Description clinique</i>	28
a) Contenu vaginal purulent ou mucopurulent	28
b) Diamètre cervical et liquide intra-utérin	31
II. EPIDEMIOLOGIE DES ENDOMETRITES	34
A. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE ET ANALYTIQUE.....	34
1. <i>Endomérite clinique</i>	34
a) Prévalence	34
b) Facteurs de risque associés à l'endomérite clinique	34
2. <i>Endomérite subclinique</i>	35
a) Prévalence et incidence.....	35
b) Facteurs de risque associés à l'endomérite cytologique	37
B. CONSEQUENCES SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION ET DE PRODUCTION	39
1. <i>Performances de reproduction</i>	39
2. <i>Performances de production</i>	41
III. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES	42
A. AGENTS PATHOGENES IMPLIQUES DANS LA CONTAMINATION UTERINE POSTPARTUM ET DANS L'INFECTION DE L'ENDOMETRE	42
1. <i>Une colonisation permise par la perte d'étanchéité du col utérin et qui s'estompe dans le temps</i>	42
2. <i>Espèces bactériennes impliquées dans les infections utérines</i>	44
3. <i>Facteurs liés à l'agent infectieux et associés à la sévérité de l'endomérite</i>	44
a) Le pouvoir pathogène.....	44
b) Relation « dose – effet »	45
B. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE LORS D'UNE INFECTION DE L'ENDOMETRE.....	47
1. <i>Les cellules endométriales, acteur fondamental de la réponse immunitaire innée</i>	47
a) Une réponse aboutissant à la synthèse de multiples médiateurs de l'inflammation.....	47
(1) Les cytokines et les chimiokines	47
(a) Une synthèse déclenchée par interaction entre LPS et TLR4	47
(i) La fixation du LPS au TLR4 aboutit à la synthèse de cytokines et de chimiokines	47
(ii) Voies de signalisation impliquées	48
(b) ... ou résultant de l'interaction d'autres facteurs microbiens et de récepteurs TLR	49
(c) Une sécrétion de cytokines et de chimiokines polarisée	51
(d) Une sécrétion de cytokines amplifiée par la lyse des cellules endométriales	51
(e) Infection à <i>T. pyogenes</i> et activation de l'inflammasome.....	51
(f) Effet des hormones stéroïdes sur la synthèse de cytokines et de chimiokines par l'endomètre ?	52

(2) L'interféron de type I, IFN β	52
(3) Les prostaglandines pro-inflammatoires	52
(a) La fixation du LPS au TLR4 aboutit à la synthèse de PGE2 et PGF2 α	52
(b) Rôle des prostaglandines dans l'immunité innée utérine	53
(c) Influence des hormones stéroïdes	53
(4) Les peptides antimicrobiens et les mucines : synthèse par l'endomètre et rôle dans l'immunité innée locale	54
(a) Les peptides antimicrobiens	54
(i) Rôle dans l'immunité innée	54
(ii) Influence des hormones stéroïdes	54
(b) La mucine MUC-1	54
(i) Rôle dans l'immunité innée	54
(ii) Influence des hormones stéroïdes	55
(5) Les protéines de la phase aiguë	55
b) La réponse immunitaire innée est initiée précocement	55
2. <i>Rôle de l'immunité adaptative dans la physiopathologie de l'endométrite ?</i>	57
3. <i>Caractéristiques de la réponse lors d'endométrite</i>	57
a) Le profil cytokinique pro-inflammatoire est exagéré de manière précoce et persistante lors d'endométrite	57
(1) Mise en évidence expérimentale	57
(2) Mécanismes mis en évidence	59
(a) STAT3 et surexpression des gènes <i>il6</i> et <i>il8</i>	59
b) Une réponse adaptative cellulaire modifiée chez les vaches avec endométrite subclinique	60
(1) Les lymphocytes B	60
(2) L'endométrite est associée à une plus grande quantité de lymphocytes T CD8+ et une plus faible quantité de lymphocytes T CD4+ et T _{reg} dans la lumière utérine	61
C. RÔLE DU FOND GÉNÉTIQUE DANS LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ET POSSIBLES EFFETS DE LA SÉLECTION GÉNÉTIQUE POUR CERTAINS CARACTÈRES DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	61
1. <i>Le contrôle génétique de la prédisposition à l'endométrite est actuellement inconnu</i>	61
2. <i>Possibles effets de la sélection génétique pour la résistance aux mammites sur la réponse immunitaire lors d'infection utérine postpartum</i>	62
a) La sélection génétique pour la résistance aux mammites sur le critère CCS dans le lait modélisée par la production de lignées divergentes	62
(1) Production de deux lignées divergentes sur le critère CCS pour connaître les effets de la sélection génétique sur le critère de résistance aux mammites	62
(2) Identification d'un variant de <i>Socs2</i> prédisposant aux mammites	64
b) La protéine SOCS-2	65
c) Rôle de SOCS-2 dans la réponse immunitaire innée	65
(1) Mise en évidence expérimentale	65
(2) Mécanismes d'action mis en évidence	66
(a) La voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT	66
(b) SOCS-2 limite l'activation du facteur de transcription STAT 3	66
(c) Compétition avec la molécule STAT pour les récepteurs cytokiniques	66
(d) Dégradation protéasomale des protéines impliquées dans le système JAK/STAT	67
CHAPITRE II	69
ETUDE EXPERIMENTALE	69
I. INTRODUCTION	70
II. MATERIELS ET METHODES	72
A. APPROBATION ETHIQUE	72
B. ANIMAUX	72
C. CONDITIONS D'HEBERGEMENT ET ALIMENTATION	72
D. SYNCHRONISATION DES CYCLES SEXUELS ET PHASE PROGESTERONIQUE	73
MISE EN PLACE DES IMPLANTS DE NORGESTOMET	73
INDUCTION DE LA LUTEOLYSE PAR INJECTION DE PROSTAGLANDINES F2 ALPHA (PGF2 α)	73
E. CONDITIONS D'HEBERGEMENT PREOPERATOIRES	73
F. PREPARATION ET CONSERVATION DE L'INOCULUM	74

G.	INOCULATION INTRA-UTERINE PAR VOIE CŒLIOSCOPIQUE.....	74
H.	SUIVI CLINIQUE.....	74
I.	DONNEES PARACLINIQUES	75
1.	<i>Prises de sang</i>	75
2.	<i>Hémogramme</i>	75
J.	PRELEVEMENT ET PESEE DE L'UTERUS	75
K.	ANALYSE BACTERIOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DU CONTENU UTERIN.....	75
L.	ANALYSE STATISTIQUE	76
III.	RESULTATS.....	76
A.	FREQUENCES CARDIAQUE, RESPIRATOIRE ET TEMPERATURE RUMINALE	76
B.	CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES DE L'UTERUS ET DES OVAIRES	81
C.	DONNEES D'HEMOGRAMME	83
D.	ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU CONTENU UTERIN.....	87
E.	ANALYSE CYTOLOGIQUE DU CONTENU UTERIN.....	89
IV.	DISCUSSION	91
A.	ANALYSE CRITIQUE DU MODELE EXPERIMENTAL UTILISE	91
1.	<i>Critères d'inclusion et d'exclusion</i>	91
2.	<i>Comparaison des animaux des deux lignées avant l'inoculation</i>	91
3.	<i>Comparaison et analyse statistique de groupes à faible effectif</i>	92
4.	<i>Taille de l'effectif du groupe témoin</i>	95
B.	RESULTATS PRINCIPAUX ET PERSPECTIVES	95
V.	CONCLUSION.....	99
	REFERENCES	101
	ANNEXES.....	112
	ANNEXE 1.	112
	ANNEXE 2.	114
	ANNEXE 3.	115
	ANNEXE 4.	116
	ANNEXE 5.	117
	ANNEXE 6.	118
	ANNEXE 7.	119
	ANNEXE 8.	120
	ANNEXE 9.	121
	ANNEXE 10.	122

Table des illustrations

- Fig. 1.** Schéma de l'utérus bipartite de la brebis. Adapté de Bonnes (Bonnes, 1988) **23**
- Fig. 2.** Aspect histologique de la corne utérine d'une vache en metœstrus en coupe transversale. (Bacha and Bacha, 2012, p. 253) **24**
- Fig. 3.** Aspect histologique d'une caroncule d'utérus bovin. (Bacha and Bacha, 2012, p. 253) **25**
- Fig. 4.** Aspect histologique d'une caroncule utérine dans l'espèce bovine. (Bacha and Bacha, 2012, p. 253) **25**
- Fig. 5.** Aspect histologique d'un endomètre normal à 46 – 54 jours postpartum et lors d'inflammation. (Karstrup et al., 2017). **26**
- Fig. 6.** Evaluation du contenu vaginal selon l'échelle de Williams. (Sheldon et al., 2006; Williams et al., 2005) **29**
- Fig. 7.** Ecoulement vaginal purulent et/ou endométrite cytologique. (Dubuc et al., 2010a) **31**
- Fig. 8.** Incidence de l'endométrite clinique et subclinique après le part. Adapté de Sheldon (Sheldon et al., 2009) **36**
- Fig. 9.** Prévalence de l'endométrite subclinique à l'échelle des troupeaux (38 troupeaux). Adapté de Cheong (Cheong et al., 2011) **37**
- Fig. 10.** La perte d'étanchéité du col utérin survenant lors de la parturition rend possible la colonisation ascendante de l'utérus par les bactéries présentes dans le vagin, principalement *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* et des bactéries anaérobies. Les glycoprotéines, peptides antimicrobiens et mucines présentes dans le vagin et le cervix limitent la croissance bactérienne et la colonisation de l'utérus. Le rôle joué par le pH et la flore vaginale résidente n'est pas clairement défini. Toutefois un grand nombre de bactéries atteint la lumière utérine provoquant via l'exposition des facteurs de virulence comme le LPS (Lipopolysaccharide) et la PLO (cholesterol-dependent cytolysin pyolysin) aux cellules hématopoïétiques et endométriales l'afflux de neutrophiles, macrophages. Le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans la réponse à l'infection. (Sheldon and Owens, 2017) **43**
- Fig. 11.** Proportion de vaches dont l'utérus est contaminé par des bactéries après le part. (Sheldon, 2004) **43**
- Fig. 12.** Catégorisation des espèces de bactéries, isolées par cultures aérobie et anaérobie à partir d'écouvillons utérins de vaches, basée sur le pouvoir pathogène. (Sheldon et al., 2002b) **44**
- Fig. 13.** Le grade de l'endométrite clinique reflète le titre des bactéries pathogènes. (Williams et al., 2005) **46**

- Fig. 14.** La synthèse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires en réponse à la fixation du LPS bactérien à la surface des cellules endométriales est MyD88-dépendante. (Wang et al., 2015) **49**
- Fig. 15.** La fixation du LPS ou des lipopeptides aux TLR des cellules endométriales aboutit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, chemokines et prostaglandines. La transduction du signal implique le système MYD88 et l'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NFκB. (Sheldon et al., 2014) **50**
- Fig. 16.** La lumière de l'utérus est colonisée après le vêlage par de nombreuses espèces bactériennes, *Escherichia coli* et *Trueperella pyogenes* étant les plus fréquentes parmi les bactéries pathogènes. Elles sont reconnues par les cellules de l'immunité innée classiques mais aussi et surtout par les TLR exprimés à la surface des cellules endométriales, et provoquent *in fine* la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1, IL-6 et IL-8. Ces cytokines recrutent et activent les agents de la phagocytose, neutrophiles et macrophages, sur le site de l'infection. *Trueperella pyogenes* libère le facteur de virulence PLO responsable de la cytolysse du stroma endométrial essentiellement. (Carneiro et al., 2016) **56**
- Fig. 17.** Une boucle de rétrocontrôle positif impliquant IL-6 et le facteur de transcription STAT3 entretient la production d'IL-8 par des cellules endométriales soumises à une exposition prolongée au LPS. (Cronin et al., 2016) **60**
- Fig. 18.** Structure des protéines de la famille SOCS. (Piessevaux et al., 2008) **65**
- Fig. 19.** Mécanismes d'action des protéines de la famille SOCS. (Piessevaux et al., 2008). **68**
- Fig. 20.** Fréquences cardiaque et respiratoire chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé. **77**
- Fig. 21.** Températures chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé. **79**
- Fig. 22.** Poids utérin moyen des groupes contrôle, CCS- et CCS+. **81**
- Fig. 23.** Aspect macroscopique de l'endomètre utérin d'une brebis après section longitudinale de l'utérus, 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*Escherichia coli*. **81**
- Fig. 24.** Concentrations sanguines de leucocytes, neutrophiles, monocytes et lymphocytes chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé, à t0 puis t24. **83**
- Fig. 25.** Concentration sanguine de plaquettes chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé à t0 puis t24. **85**
- Fig. 26.** Concentration bactérienne moyenne du contenu utérin des animaux des groupes CCS- inoculés et CCS+ inoculés en Log₁₀ UFC / mL. **87**
- Fig. 27.** Concentration des différents types de leucocytes dans le lavage utérin 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*E. coli*, exprimée en Log₁₀ / mL. **89**

- Fig. 28.** Graphe des résidus de la variable ‘Concentration en cellules totales dans le lavage utérin’ et graphe des résidus de la même variable transformée par la fonction logarithme. **92**
- Fig. 29.** Graphe des résidus pour la variable ‘Concentration de monocytes dans le contenu utérin’ transformée par la fonction logarithme. **93**
- Fig. 30.** Graphe des résidus pour la variable ‘Concentration sanguine de lymphocytes à t0’ non transformée. **93**
- Fig. 31.** L’absence de différence significative entre le groupe CCS+ inoculé et le groupe CCS-inoculé concernant la concentration des neutrophiles (transformée en Log10) dans le lavage utérin est possiblement due à un manque de puissance, lequel est plus probablement lié à la faible taille des effectifs (la variance associée aux deux groupes n’étant pas élevée). **94**
- Fig. 32.** L’absence de différence significative entre le groupe CCS+ inoculé et le groupe CCS-inoculé concernant le poids utérin est possiblement due à un manque de puissance, lequel est probablement la conséquence d’une faible taille des effectifs et/ou une variance trop élevée. **95**

Tableaux

Tableau 1. Facteurs de risque associés à l'endométrite clinique à l'échelle individuelle.	35
Tableau 2. Facteurs de risque associés à l'endométrite subclinique à l'échelle individuelle.	38
Tableau 3. Impact de l'endométrite sur le risque relatif de gestation.	40

Liste des annexes

Annexe 1. Tableau illustrant la multitude des valeurs de seuils retenus pour définir l'endométrite subclinique.	112
Annexe 2. Tableau illustrant les prévalences de l'endométrite clinique selon les études.	114
Annexe 3. Fiche de suivi clinique.	115
Annexe 4. Moyennes et écarts-types des fréquences cardiaques et respiratoires à t0 et t24.	116
Annexe 5. Moyennes et écarts-types du poids utérin.	117
Annexe 6. Observations faites lors du prélèvement de l'utérus et des ovaires.	118
Annexe 7. Moyennes et écarts-types des concentrations sanguines de leucocytes, neutrophiles, monocytes et lymphocytes à t0 et t24.	119
Annexe 8. Moyennes et écarts-types des concentrations sanguines de plaquettes à t0 et t24.	120
Annexe 9. Moyennes et écarts-types des concentrations bactériennes dans le liquide issu du lavage utérin.	121
Annexe 10. Moyennes et écarts-types des concentrations de cellules totales, neutrophiles, monocytes et lymphocytes dans le liquide issu du lavage utérin.	122

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de variance

AP-1: Activator protein 1

ARN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide désoxyribonucléique messenger

BCS : body condition score

BHB : beta-hydroxybutyrate

BNBD4 : Bovine neutrophil beta defensin 4

bpm : Battements par minute

CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2

CCS : Comptage des cellules somatiques

CD14 : Cluster of Differentiation 14

CD4+ : Cluster of differentiation 4-positive T cells

CD8+ : Cluster of differentiation 8-positive T cells

CIS : Cytokine-inducible SH2 domain-containing-protein

CXCL5 : C-X-C motif chemokine ligand 5

CxCL8 : C-X-C motif chemokine ligand 8

DAMP : Damage associated molecular pattern

DEFB5 : Defensin beta 5

EnPEC : Endometrial pathogenic Escherichia coli

EP2 : E prostanoid receptor 2

EP4 : E prostanoid receptor 4

FSH : Follicle stimulating hormone

GnRH : Gonadotropin releasing hormone

HP : Haptoglobin

IC : Intervalle de confiance

ido1 : Gène indoleamine 2,3-dioxygenase 1

IFN β : Interferon beta

IgG : Immunoglobulin gamma

IKB : Inhibitor of nuclear factor kappa B

IL-1 β : Interleukin 1 alpha, : Interleukine 1 bêta, Interleukin 1 beta

IL-10 : Interleukin 10

il17a : Gène interleukin 17 alpha
IL1R : Interleukin 1 receptor
IL1R2 : Interleukin 1 receptor type 2
IL-6 : Interleukin 6
IL-8 : Interleukin 8, Interleukin 8
ilrap : Gène interleukin 1 receptor accessory protein
INRA : Institut national de recherche agronomique
IRAK1 : IL-1R-associated kinase 1
IRAK4 : IL-1R-associated kinase 4
JAK : Janus kinase
jpp : Jours postpartum
LAP : Lingual antimicrobial peptides
LH : Luteinising hormone
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MD2 : Myeloid Differentiation 2
mpm : Mouvements par minute
MUC-1. Mucin 1
MyD88 : Myeloid Differentiation factor 88
NFκB : Nuclear factor kappa B
NK : Natural killer
OR : Odds ratio
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PBS : Phosphate buffered saline
PGE2 : Prostaglandin E2
PGF2α : Prostaglandin F2 alpha
PLO : Cholesterol-dependent cytolysin pyolysin
PRR : Pattern recognition receptor
QTL : Quantitative Trait Locus
RR : Risque relatif
SAA. : Serum amyloid A
SAA3 : Serum amyloid A 3
SH2 : src homology 2
SOCS-2 : Suppressor of cytokine signaling 2

Socs2 : Gène suppressor of cytokine signaling 2
STAT : Signal transducers and activators of the transcription 3
TAB : TAK1 binding protein
TAK1 : TGF beta-activated kinase 1
TAP : Tracheal antimicrobial peptides
Th2 : T helper 2
TLR4 : Toll-like receptor 4
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TRAF6 : TNFR-associated factor 6
UFC : Unité formant colonie
VPP : Valeur prédictive positive
VPN : Valeur prédictive négative

Introduction

Durant le postpartum, l'utérus d'une femelle comme la vache subit un certain nombre d'événements en préparation de la gestation suivante : remodelage tissulaire, régénération de l'épithélium, élimination des bactéries colonisant de manière presque systématique la lumière utérine et résolution des infections utérines (Sheldon et al., 2014). Les performances de reproduction sont compromises chez certaines vaches laitières du fait d'une incapacité à résoudre l'inflammation utérine, le plus souvent limitée à l'endomètre, dont la présence au début du postpartum est physiologique et probablement bénéfique à l'élimination des résidus placentaires et à l'involution. La réponse à l'infection et en particulier l'inflammation, d'intensité variable, est la résultante d'une interaction complexe entre les génomes de l'hôte et ceux des agents pathogènes qui colonisent la lumière utérine, ainsi que l'environnement. Certains animaux placés dans les mêmes conditions environnementales et soumis aux mêmes pressions infectieuses montrent une meilleure résistance aux infections soulignant le rôle important du fond génétique dans le contrôle des infections. Les études génomiques ont permis d'identifier des régions du génome dont la contribution à ces mécanismes est majeure. Pour l'étude de la prédisposition à l'inflammation mammaire, une sélection divergente sur le critère de la concentration des cellules somatiques dans le lait (CCS) a été réalisée, conduisant à la production de deux lignées génétiques dont la sensibilité aux mammites diffère significativement. Par ailleurs, des régions du génome désignées QTL (pour Quantitative Trait Locus) qui contribuent le plus à cette différence de sensibilité aux infections mammaires ont été identifiées. Des QTL modulant la sensibilité à l'inflammation de la glande mammaire (Rupp et al., 2015) ont été décrits dans une étude génétique conduite chez la brebis laitière pour le critère CCS. Après séquençage d'une des régions identifiées et la comparaison entre animaux porteurs de l'une ou l'autre des deux formes alléliques, une mutation ponctuelle du gène *Socs2*, contribuant fortement au contrôle de l'inflammation mammaire, a été identifiée.

S'agissant de deux infections distinctes dans des organes et des tissus très différents (glande mammaire et utérus), possiblement provoquées par les mêmes germes, il est logique de s'interroger sur l'effet d'une telle différence de sensibilité d'origine génétique sur le contrôle des infections en général, et notamment sur la sensibilité à l'infection et à l'inflammation utérine chez des animaux dont la sensibilité aux infections mammaires est significativement différente.

La plupart des données sur l'endométrite concernent la vache, chez laquelle cette affection est fréquente. C'est pourquoi le chapitre introductif donne une description de cette affection dans l'espèce bovine. La prévalence chez la brebis est faible mais cette espèce constitue un excellent modèle d'étude de l'effet de la sélection génétique menée sur le critère CCS sur la résistance aux infections, justifiant le choix de cette espèce dans l'étude expérimentale décrite dans le second chapitre.

Dans un chapitre introductif, les définitions de l'endométrite et sa description clinique sont dans un premier temps détaillées, avant d'en présenter l'épidémiologie puis les conséquences sur les performances de reproduction et de production. La troisième partie a pour objectif de détailler la physiopathologie de l'endométrite, en indiquant quels sont les agents pathogènes en cause, en présentant les caractéristiques de la réponse immunitaire et enfin le rôle du fond génétique et les possibles effets de la sélection génétique pour le caractère de résistance aux mammites sur la réponse immunitaire endométriale.

Dans un second chapitre, les résultats de l'évaluation de la réponse à l'infection expérimentale par *Escherichia coli* réalisée sur des brebis dont la sensibilité aux infections mammaires est significativement différente, sont décrits puis analysés.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Description médicale de l'endomérite

L'endomérite est rare chez la brebis (Pugh and Baird, 2012) et a été plus largement étudiée dans l'espèce bovine, chez qui l'affection est plus fréquente. La description est ainsi faite dans l'espèce bovine, bien que l'étude expérimentale ait été menée dans l'espèce ovine.

A. Anatomie de l'utérus ovin

L'utérus bipartite de la brebis est composé d'un cervix, d'un corps utérin relativement court (1 – 2 cm), et de deux cornes utérines mesurant 10 à 12 cm de long (Frandsen et al., 2009). Chacune des cornes utérines se poursuit crânialement par un oviducte, la zone de transition étant appelée jonction utéro-tubaire (cf. Fig. 1).

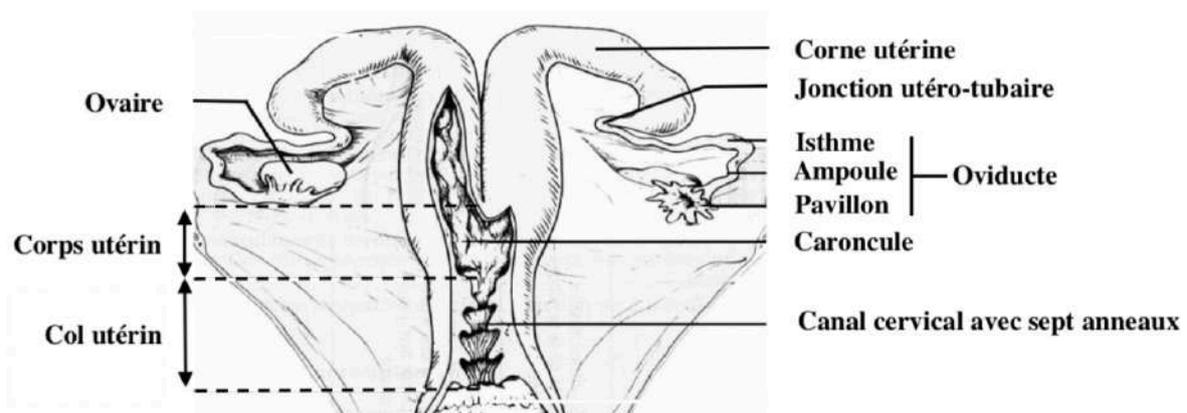


Fig. 1. Schéma de l'utérus bipartite de la brebis. Adapté de Bonnes (Bonnes, 1988)

B. Histologie de la paroi utérine

Depuis la lumière de l'utérus vers les couches plus profondes, trois couches histologiques sont décrites (cf. Fig. 2) (Bacha and Bacha, 2012; Espejel and Medrano, 2017; Frandsen et al., 2009):

- L'endomètre ou muqueuse utérine : il est formé d'un épithélium cubique simple ou cylindrique simple et cilié sur certaines portions, au contact de la lumière utérine et d'un stroma. Le stroma est organisé en deux *strata* : le *stratum compactum* au contact de l'épithélium, particulièrement dense en fibroblastes et le *stratum spongiosum* riche en vaisseaux sanguins et en cellules immunitaires. A l'exception des caroncules utérines, les deux *strata* contiennent les glandes utérines, tubulaires, simples et ramifiées dont les

sécrétions permettent la survie et le développement du conceptus dans la période pré-implantatoire (Gray et al., 2001). Les caroncules utérines sont des proéminences de l'endomètre non glandulaires et sont formées par du tissu conjonctif riche en fibroblastes et en vaisseaux sanguins (cf. Fig. 3 et Fig. 4) ; elles sont le site d'attachement des membranes fœtales.

- Le myomètre ou musculuse utérine, constitué de fibres musculaires lisses disposées en anneaux ainsi que de vaisseaux sanguins ; il est situé entre l'endomètre et le périomètre.
- Le périomètre ou séreuse utérine, constituant la couche externe de l'utérus, est une fine couche de tissu conjonctif.

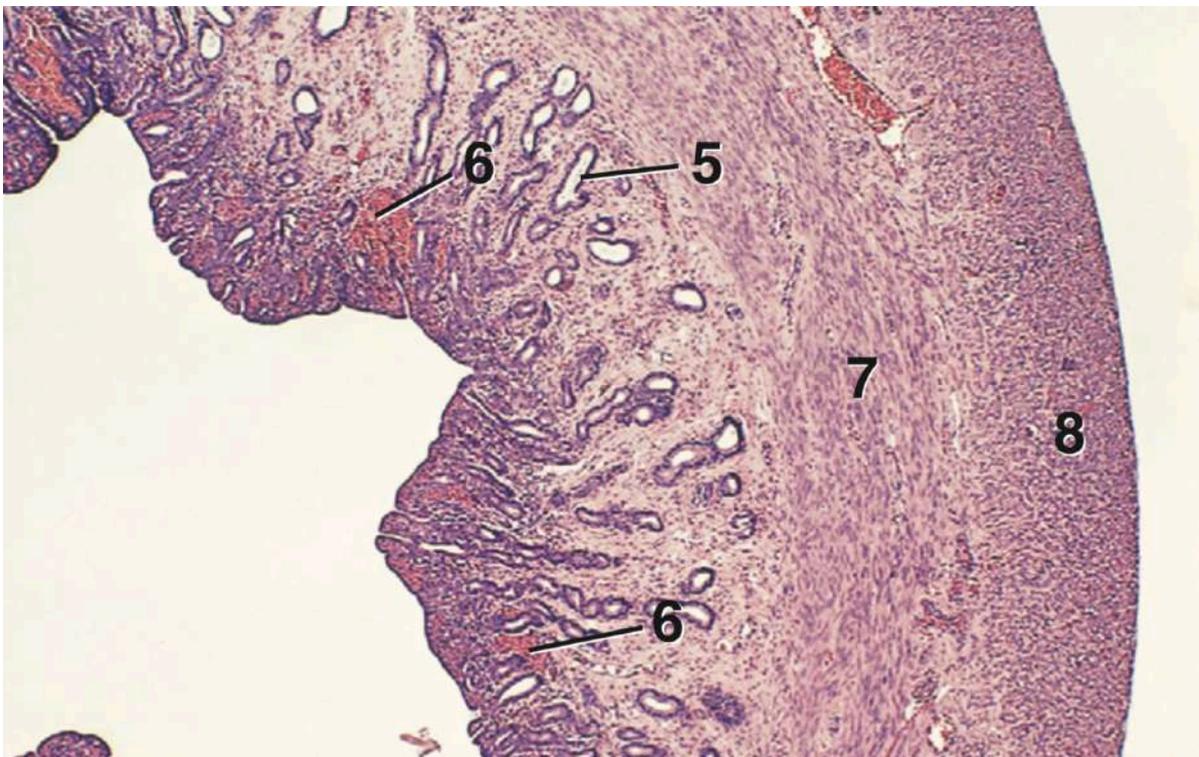


Fig. 2. Aspect histologique de la corne utérine d'une vache en métœstrus en coupe transversale. Grossissement $\times 25$. Légende : 5, glande utérine ; 6, zone hémorragique ; 7, myomètre (couche circulaire) ; 8, myomètre (couche longitudinale) (Bacha and Bacha, 2012, p. 253)

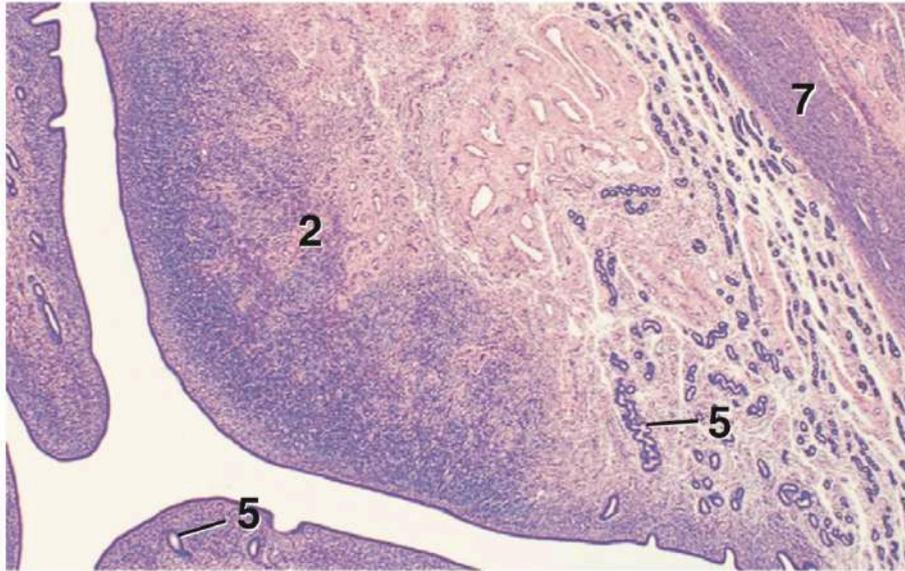


Fig. 3. Aspect histologique d'une caroncule d'utérus bovin. Grossissement $\times 12,5$. Légende : 2, caroncule ; 5, glandes utérines ; 7, myomètre (couche circulaire). (Bacha and Bacha, 2012, p. 253)

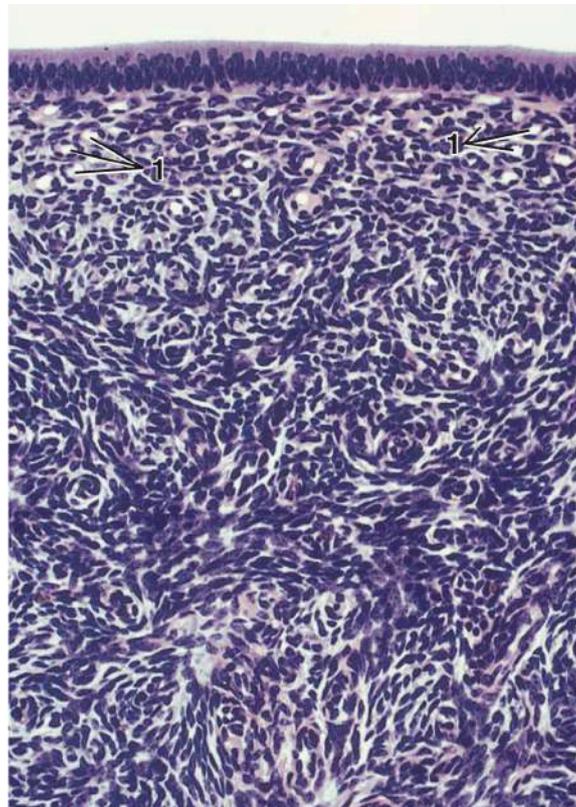


Fig. 4. Aspect histologique d'une caroncule utérine dans l'espèce bovine. Grossissement $\times 180$. Légende : 1, vaisseaux sanguins dans un réseau dense de fibroblastes. Coloration hématoxyline éosine. (Bacha and Bacha, 2012, p. 253)

C. Endométrite : définitions et description clinique

1. Définition histopathologique

L'endométrite est définie histologiquement par une inflammation limitée à l'endomètre, sans extension aux autres couches de la paroi utérine, caractérisée par la perte de l'intégrité de l'épithélium, l'infiltration et éventuellement l'accumulation de cellules inflammatoires – granulocytes neutrophiles et cellules mononucléées – et enfin la présence d'une congestion et d'un œdème du stroma (Bondurant, 1999) (cf. Fig. 5). L'examen histopathologique de biopsies utérines permet d'établir le diagnostic définitif d'endométrite (Sheldon et al., 2006).

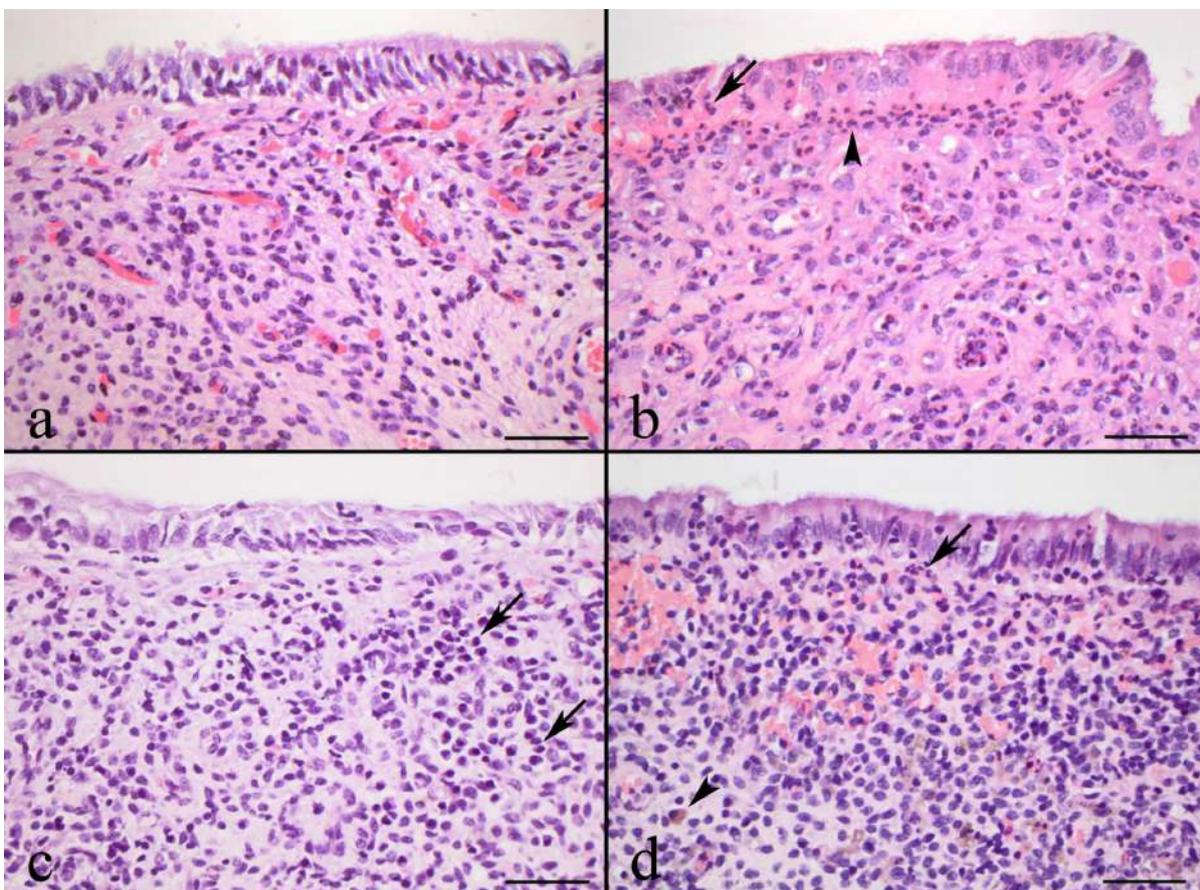


Fig. 5. Aspect histologique d'un endomètre normal à 46 – 54 jours postpartum (a) et lors d'inflammation (b, c et d) (Karstrup et al., 2017). (b) Endomètre entre 4 et 12 jours postpartum : infiltration modérée de neutrophiles dans l'endomètre, en particulier au contact avec l'épithélium. (c) et (d) Endomètre entre 24 et 32 jours postpartum : infiltrations modérée (c) et sévère (d) de cellules inflammatoires mononucléées dans le stroma. Barre : 50 micromètres. Coloration hématoxyline éosine.

2. Définitions médicales

Chez la vache laitière, l'endométrite postpartum est une inflammation de l'endomètre ayant les caractéristiques histopathologiques sus-citées, sans signe clinique systémique associé et présente au-delà de 21 jours après le part (Sheldon et al., 2006). Deux entités ont été définies : l'endométrite clinique et l'endométrite subclinique. Les critères diagnostiques ont été déterminés en fonction des conséquences sur les performances de reproduction (Dubuc et al., 2010a; LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006).

a) *Endométrite clinique*

La présence dans le vagin d'un écoulement utérin purulent à partir de 21 jours postpartum ou d'un écoulement utérin muco-purulent visible dans le vagin au-delà de 26 jours postpartum définissent l'endométrite clinique chez la vache (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006). Avant 21 jours, le risque de diagnostiquer à tort une endométrite clinique est élevé puisqu'un grand nombre de vaches éliminent les lochies d'aspect variable, et qui peuvent être confondues avec un écoulement vaginal purulent (Sheldon et al., 2006). L'élimination des lochies débute avec le part, est intense dans les premières 48 heures suivant la mise-bas, se poursuit en moindre mesure au-delà jusqu'à cesser généralement en fin de deuxième semaine postpartum, l'observation de lochies après le 20^{ème} jour postpartum étant rare. Ces lochies sont constituées d'un mélange de glaires et de sécrétions endométriales, de liquide amniotique, de restes d'enveloppes fœtales, de débris de placenta et de sang provenant des vaisseaux ombilicaux sectionnés lors de l'expulsion du fœtus. Elles sont inodores et de couleur brun lie-de-vin, parfois grumeleuses.

b) *Endométrite subclinique*

L'endométrite subclinique, dite aussi cytologique, se traduit par une augmentation de la proportion de granulocytes neutrophiles à l'analyse cytologique d'échantillons obtenus à partir de l'endomètre à l'aide d'une cytobrosse ou d'un lavage utérin (Gilbert et al., 2005; Kasimanickam et al., 2004). Cette affection est très étudiée car elle est associée à une diminution significative des performances de reproduction (de Boer et al., 2014; Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2009). Elle ne conduit pas à l'accumulation dans le vagin de matériel purulent ou mucopurulent, et l'animal ne présente aucun signe clinique systémique associé (Gilbert et al., 2005).

Cependant, toutes les études ne s'accordent pas sur la quantité (ou proportion) de granulocytes neutrophiles et le nombre de jours postpartum au-delà desquels l'endométrite subclinique doit être considérée (cf. Annexe 1. **Tableau illustrant la multitude des valeurs de seuils retenus pour définir l'endométrite subclinique. Adapté de (de Boer et al., 2014).**). Selon Sheldon (Sheldon et al., 2006), elle est définie par la présence de granulocytes neutrophiles en proportion supérieure à 18% à l'examen cytologique de l'utérus réalisé entre 20 et 33 jours post-partum, ou en proportion supérieure à 10% entre 34 et 47 jours postpartum, sans écoulement purulent ou mucopurulent à l'inspection du vagin, comme indiqué dans l'étude réalisée par Kasimanickam (Kasimanickam et al., 2004). Les seuils retenus par de Boer (de Boer et al., 2014) sont plus bas : entre 35 et 40 jours postpartum une proportion de granulocytes neutrophiles supérieure à 5% est associée à de moindres performances de reproduction.

3. Description clinique

a) *Contenu vaginal purulent ou mucopurulent*

La définition d'une endométrite clinique est basée sur la présence dans le vagin d'un contenu purulent ou mucopurulent à partir de 21 ou 26 jours respectivement, sans signe clinique systémique associé (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006). L'écoulement vulvaire du contenu utérin n'est pas systématique (McDougall, 2001), et par conséquent, l'observation de la vulve n'est pas une méthode fiable pour diagnostiquer une endométrite clinique. Différentes méthodes permettent d'apprécier l'aspect du contenu vaginal : l'examen vaginal manuel, la vaginoscopie et/ou le Metrichick®. L'examen vaginal manuel suivi de la collecte du contenu vaginal pour inspection est une méthode simple, économique, et rapide. Aussi, lorsque les mesures d'hygiène sont respectées, cette méthode ne majore pas la contamination de l'utérus et ne provoque pas de retard à l'involution utérine (Sheldon et al., 2002a). L'utilisation d'un vaginoscope ou celle du Metrichick sont des méthodes diagnostiques largement utilisées (de Boer et al., 2014). Plusieurs systèmes de notation sont décrits et chacun d'eux permet de grader l'aspect du contenu vaginal et la sévérité de l'atteinte. Les critères utilisés sont la couleur, la proportion, le volume de pus et éventuellement l'odeur :

- Le système de notation décrit initialement par Williams (Williams et al., 2005) compte quatre niveaux de score (cf. Fig. 6): la note = 0 est attribuée lorsque le contenu vaginal est un mucus translucide ou clair, note = 1 lorsque le mucus contient des flammèches de pus blanc à beige, note = 2 lorsque le contenu vaginal contient du matériel mucopurulent dont la proportion est inférieure ou égale à 50%, et enfin note = 3 lorsque le

contenu vaginal est constitué à plus de 50% de matériel purulent, voire sanguinolent. Ce système de notation est utilisé par quelques études pour décrire et évaluer l'endométrite clinique : score 3 à partir de 21 jours postpartum, et score 2 ou 3 à partir de 26 jours (Potter et al., 2010).

- Le système de notation décrit par McDougall (McDougall et al., 2007) intègre le critère 'odeur du contenu' : note = 0 en l'absence de contenu, note = 1 en présence d'un mucus clair, note = 2 en présence de quelques flammèches de matériel purulent, note = 3 en présence de matériel muco-purulent dont la proportion de pus n'excède pas 50%, note = 4 en présence de matériel muco-purulent dont la proportion de pus excède 50%, note = 5 en présence de matériel muco-purulent dont la proportion de pus excède 50% et d'odeur fétide.
- Enfin Plöntzke (Plöntzke et al., 2011) définit un troisième système de notation intégrant l'aspect et l'odeur du contenu vaginal : note = 0 pour un contenu vaginal clair et transparent, note = 1 pour un contenu muco-purulent, note = 2 pour un contenu purulent et note = 3 pour un contenu purulent et d'odeur fétide.

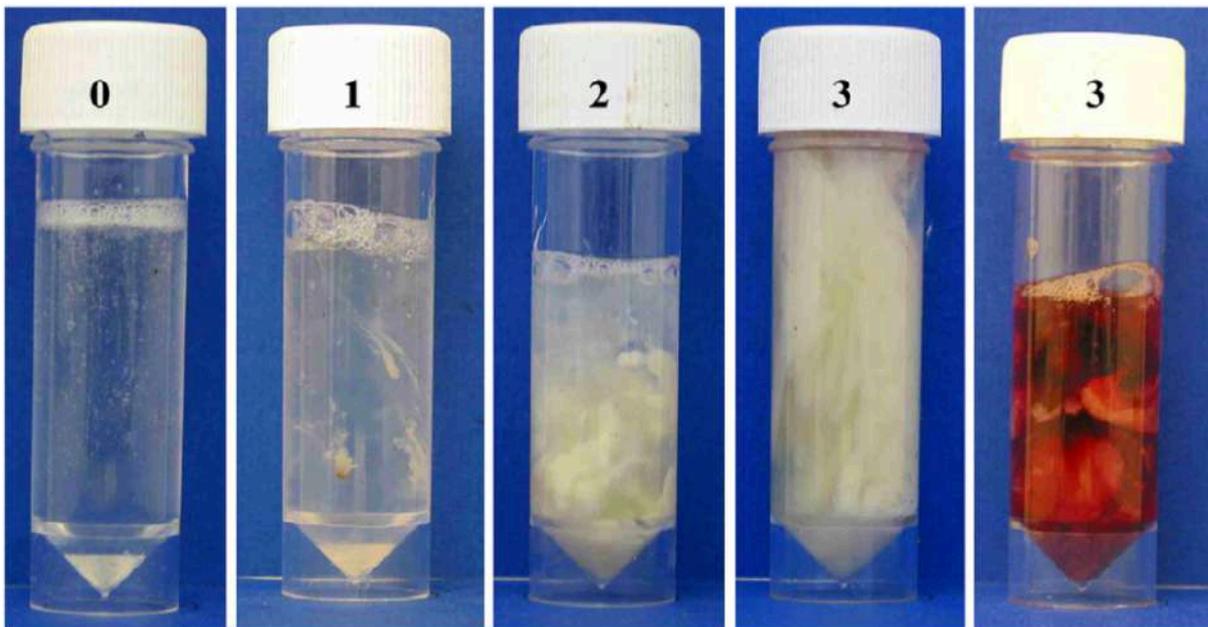


Fig. 6. Evaluation du contenu vaginal selon l'échelle de Williams et al. 0 : mucus clair ou translucide ; 1 : mucus contenant des flammèches de pus blanc à blanc cassé ; 2 : proportion de matériel mucopurulent blanc à blanc cassé $\leq 50\%$; 3 : proportion de matériel purulent blanc à jaunâtre voire sanguinolent $\geq 50\%$. (Sheldon et al., 2006; Williams et al., 2005)

On peut cependant s'interroger sur la spécificité de la présence d'un contenu vaginal purulent ou muco-purulent pour le diagnostic de l'endométrite. En effet une cervicite ou une vaginite peuvent être à l'origine d'une accumulation de matériel muco-purulent ou purulent dans le vagin (Deguillaume et al., 2012; Dubuc et al., 2010a; Hartmann et al., 2016). L'étude menée par Dubuc (Dubuc et al., 2010a) sur des vaches entre 32 et 38 jours postpartum détermine pour les notes 2, 3 et 4 de l'échelle définie par McDougall (McDougall et al., 2007), attribuées selon l'aspect du contenu vaginal, les valeurs de spécificité, sensibilité ainsi que les valeurs prédictives pour le diagnostic de l'endométrite. Ces valeurs sont obtenues en prenant comme référence l'endométrite cytologique diagnostiquée selon des critères autres que ceux de Kasimanickam (Kasimanickam et al., 2004) retenus dans la définition de Sheldon (Sheldon et al., 2006) (plus précisément, dans l'étude de Dubuc : diagnostic d'endométrite cytologique si $\geq 6\%$ de granulocytes neutrophiles entre 32 et 38 jours postpartum). L'observation d'un écoulement vaginal de score ≥ 2 (mucus avec quelques flammèches de pus) permet de diagnostiquer l'endométrite avec une sensibilité de 57% et une spécificité de 62% ; lorsque la prévalence de l'endométrite cytologique est de 13,5% les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) sont de 27% et 86%, respectivement. Lorsque la note du contenu vaginal augmente, la sensibilité et la VPN diminuent tandis que la spécificité et la VPP augmentent : 30% de sensibilité, 88% de spécificité, une VPP de 38% et une VPN de 84% pour le score 3, 15% de sensibilité, 95% de spécificité, une VPP de 44% et une VPN de 83% pour le score 4. Les faibles valeurs de sensibilité associées aux notes 3 et 4 indiquent qu'une grande proportion de vaches ayant une inflammation de l'endomètre n'ont pas d'écoulement muco-purulent ou purulent et donc ne présentent pas d'endométrite clinique telle que définie par Sheldon. Aussi, quelques vaches sans inflammation de l'endomètre (à l'examen cytologique des échantillons collectés à l'aide d'une cytobrosse) ont une note de 3 ou 4, et seraient donc considérées comme ayant une endométrite clinique selon la définition de Sheldon. Pour ces raisons les auteurs remettent en question l'utilisation du critère 'écoulement vaginal purulent' dans la définition de l'endométrite clinique (Dubuc et al., 2010a) (cf. Fig. 7).

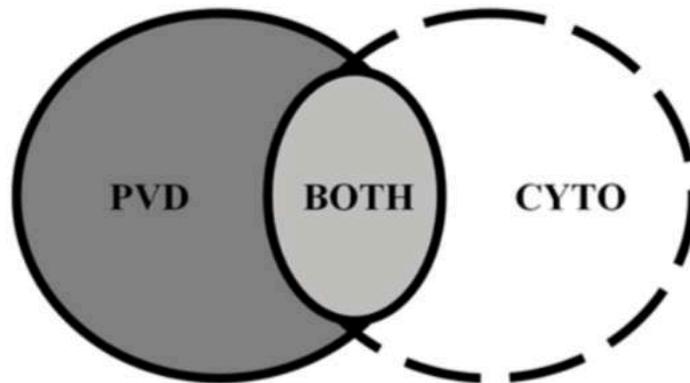


Fig. 7. *Écoulement vaginal purulent et/ou endométrite cytologique. PVD : purulent vaginal discharge (écoulement vaginal purulent). CYTO : cytological endometritis (endométrite cytologique). BOTH : cytological endometritis and purulent vaginal discharge (endométrite cytologique associée à un écoulement vaginal purulent). (Dubuc et al., 2010a)*

Une étude récente compare l'évaluation du contenu vaginal collecté par Metricheck® et l'examen échographique transrectal du contenu utérin entre 21 et 38 jours postpartum dans la prédiction du risque de gestation et conclut que l'usage combiné de ces deux méthodes assure une meilleure prédiction (Šavc et al., 2016).

b) Diamètre cervical et liquide intra-utérin

D'autres critères, la taille du col et la présence de liquide intra-utérin, ont été proposés pour le diagnostic de l'endométrite, et leurs sensibilités et spécificités ont été évaluées. L'involution utérine est le processus par lequel l'utérus recouvre après le vêlage les dimensions et le poids qui le caractérisent lorsque la vache n'est pas gravide (Gier and Marion, 1968; Sheldon, 2004). Le diamètre des cornes utérines mesure moins de 5 cm (Gier and Marion, 1968) après 3 à 5 semaines d'involution utérine voire plus lorsque la vache présente une infection utérine (Slama et al., 1991). Or le retard d'involution a pour conséquence une baisse de la fertilité et des performances de reproduction ; par exemple un diamètre cervical supérieur à 7,5 cm à 20 jours postpartum est associé à une baisse de la fertilité chez les vaches laitières (LeBlanc et al., 2002). Plusieurs études ont évalué la sensibilité et la spécificité avec lesquelles le praticien peut diagnostiquer une endométrite et/ou prédire les performances de reproduction en utilisant la mesure des dimensions du col et l'examen échographique transrectal de la cavité

utérine. Le critère utilisé communément pour prédire les performances de reproduction est le risque de gestation à 120 jours postpartum.

L'étude de Meira (Meira et al., 2012) est menée sur des vaches entre 21 et 47 jours postpartum examinées par vaginoscopie et ne présentant aucun écoulement vaginal. La méthode de référence utilisée dans cette étude pour comparer les méthodes diagnostiques est la suivante : endométrite cytologique diagnostiquée selon les critères de Kasimanickam (Kasimanickam et al., 2004) (endomérite cytologique si $\geq 18\%$ de granulocytes neutrophiles entre 21 et 33 jours postpartum ou $\geq 10\%$ de granulocytes neutrophiles entre 34 et 47 jours postpartum). La mesure échographique d'un diamètre cervical supérieur à 5 cm dans l'objectif de diagnostiquer une endométrite donne des valeurs de sensibilité et de spécificité de 56% et 73%, respectivement. Lorsque la mesure du diamètre cervical (> 5 cm) est couplée à l'observation de liquide dans la cavité utérine, la combinaison des deux critères permet d'atteindre une spécificité de 88% (et une sensibilité de 50%), ce qui en fait une méthode intéressante pour la confirmation du diagnostic d'endomérite. La seule observation de liquide utérin par échographie pour le diagnostic d'endomérite a une sensibilité de 88% et une spécificité égale à 62%. L'intérêt de la combinaison de la mesure du col utérin et de la présence de liquide dans l'utérus dans un contexte clinique (lorsqu'on ignore le statut de l'animal, en d'autres termes en l'absence de diagnostic de référence) chez une vache sans signe clinique, dépend de la prévalence de l'endomérite cytologique dans la population (entre 11 et 35% selon les études). Ainsi le calcul de la VPP donne des résultats compris, selon la prévalence considérée, entre 34% et 69%, et celui de la VPN des résultats compris entre 76% et 93%.

Dans l'étude de Dubuc (Dubuc et al., 2010a) menée sur des vaches entre 32 et 38 jours postpartum, l'endomérite cytologique diagnostiquée selon des critères autres que ceux de Kasimanickam retenus dans la définition de Sheldon (animal positif si $\geq 6\%$ de granulocytes neutrophiles entre 32 et 38 jours postpartum) constitue la méthode de référence utilisée pour déterminer l'efficacité des critères diagnostiques. La mesure par échographie d'un diamètre cervical supérieur ou égal à 5 cm dans l'objectif de diagnostiquer l'endomérite a pour sensibilité et spécificité 65% et 54%, respectivement ; la VPP est de 25% et la VPN de 86% (pour une prévalence d'endomérite cytologique de 13,5%). Lorsque la mesure du diamètre cervical est couplée à l'observation d'un écoulement vaginal de score supérieur ou égal à 3, la combinaison des deux critères diagnostiques permet d'atteindre une spécificité de 94%, les valeurs des VPP et VPN sont respectivement de 45% et 83%.

En conclusion et au vu de la prévalence de l'endométrite, comprise entre 11 et 35% selon les études, le test de dépistage basé sur l'observation intra-vaginale, simple pour le vétérinaire et peu onéreuse pour l'éleveur, d'un contenu purulent ou muco-purulent, constitue un compromis acceptable entre sensibilité élevée et spécificité élevée, parmi les tests diagnostiques à disposition. Compte-tenu de la faible valeur prédictive positive (27%) et dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux traités à tort, un test de confirmation diagnostique possédant les meilleures performances extrinsèques peut être considéré et il semblerait qu'il s'agisse de l'observation de liquide intra-utérin (sans qu'elle soit couplée à la mesure du diamètre cervical) : le praticien peut considérer qu'une vache dont le résultat est négatif à ce second test (c'est-à-dire en l'absence de liquide intra-utérin à l'échographie transrectale) est une vache saine (VPN comprise entre 84 et 97%, selon la prévalence).

II. Epidémiologie des endométrites

A. Epidémiologie descriptive et analytique

1. Endométrite clinique

a) *Prévalence*

La prévalence dépend de la période postpartum considérée, des critères utilisés pour définir l'endométrite et de la technique utilisée pour le diagnostic (collecte manuelle du contenu vaginal ou à l'aide d'un Metricheck®). Elle est comprise selon les études entre 9,4% et 35%. Le tableau en Annexe 2 regroupe les prévalences publiées dans diverses études.

b) *Facteurs de risque associés à l'endométrite clinique*

Les facteurs augmentant le risque de développer une endométrite clinique pour une vache laitière incluent : la dystocie, la naissance d'un veau mâle, la gémellité, la primiparité, la rétention des membranes fœtales et la mortinatalité (Dubuc et al., 2010b; Potter et al., 2010; Prunner et al., 2014), probablement par amplification du traumatisme utérin lors de gémellité, dystocie, vêlage d'un veau mâle ou primiparité et amplification de la contamination bactérienne en cas de rétention des membranes fœtales et mortinatalité (Dubuc et al., 2010b), le matériel nécrotique non évacué favorisant la croissance bactérienne dans la lumière utérine. De nombreux facteurs de risque ont été associés à la rétention des membranes fœtales parmi lesquels la gémellité (Muller and Owens, 1974), la mortinatalité et la dystocie (Joosten et al., 1987).

L'haptoglobine est une protéine de la phase aiguë détectable dans le sérum, dont la concentration est inférieure à 20 mg/mL chez la vache saine et augmente lors d'inflammation (Eckersall and Bell, 2010). Une concentration sérique supérieure à 0,8 g/L, est indicatrice de la présence d'une inflammation, dans la première semaine postpartum et souvent associée à la présence d'un écoulement vaginal purulent (inflammation utérine et/ou vaginale) et d'une endométrite subclinique à 35 jours postpartum (Dubuc et al., 2010b).

La perte de l'intégrité de l'épithélium liée aux traumatismes augmente la surface de stroma qui est alors exposée aux toxines bactériennes de *Trueperella pyogenes* (Amos et al., 2014). L'infection par *Trueperella pyogenes* a été associée à une plus grande sévérité de l'endométrite (Prunner et al., 2014), probablement en raison de son action cytolitique. Les facteurs de risque sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Facteurs de risque associés à l'endométrite clinique à l'échelle individuelle

Facteur de risque	OR ou RR	95% IC	Références
Gémellité	OR 2,16*	1,09 – 4,27	(Dubuc et al., 2010b)
Sexe mâle	RR 1,54*	1,01 – 2,15	(Potter et al., 2010)
Dystocie	OR 2,13*	1,43 – 3,98	(Dubuc et al., 2010b)
	RR 1,67	0,97 – 2,51	(Potter et al., 2010)
	OR 1,79*	1,12 – 2,86	(Prunner et al., 2014)
Rétention des membranes fœtales	RR 3,96*	2,58 – 4,24	(Potter et al., 2010)
Mortinatalité	RR 3,09*	2,09 – 3,83	(Potter et al., 2010)
Mérite dans la 1 ^{ère} semaine postpartum	OR 2,33*	1,41 – 3,77	(Dubuc et al., 2010b)
Concentration sérique en haptoglobine dans la première semaine postpartum $\geq 0,8$ g/L	OR 2,02*	1,29 – 3,13	(Dubuc et al., 2010b)
Primiparité	RR 1,78*	1,17 – 2,46	(Potter et al., 2010)
Angle vulvaire	RR 1,31	0,96 – 1,71	(Potter et al., 2010)
Infection à <i>Trueperella pyogenes</i>	OR 5,72*	3,07 – 10,83	(Prunner et al., 2014)

Légende. Le symbole * est apposé lorsque la *p*-value est inférieure à 0,05. IC : intervalle de confiance. OR : odds ratio. RR : risque relatif.

2. Endométrite subclinique

a) Prévalence et incidence

La prévalence de l'endométrite subclinique chez la vache laitière varie entre 11 et 35,1%, selon les études. Cette variation est en partie inhérente aux critères retenus pour définir l'endométrite subclinique à savoir la proportion de granulocytes neutrophiles et le nombre de jours qui se sont écoulés depuis le vêlage au moment de l'examen (cf. Annexe 1. **Tableau illustrant la multitude des valeurs de seuils retenus pour définir l'endométrite subclinique. Adapté de (de Boer et al., 2014).**). L'étude de Kasimanickam (Kasimanickam et al., 2004) mentionne une prévalence de 35,1% entre 20 et 33 jours postpartum, et de 34% entre 34 et 47 jours postpartum. L'incidence, qui dépend elle aussi du seuil retenu pour définir

l'endométrite subclinique, décroît globalement après 21 jours postpartum selon Sheldon (Sheldon et al., 2009) (cf. Fig. 8). La proportion de vaches avec une endométrite subclinique diminue de 48% entre la 4^{ème} à la 8^{ème} semaine postpartum (Gilbert et al., 2005).

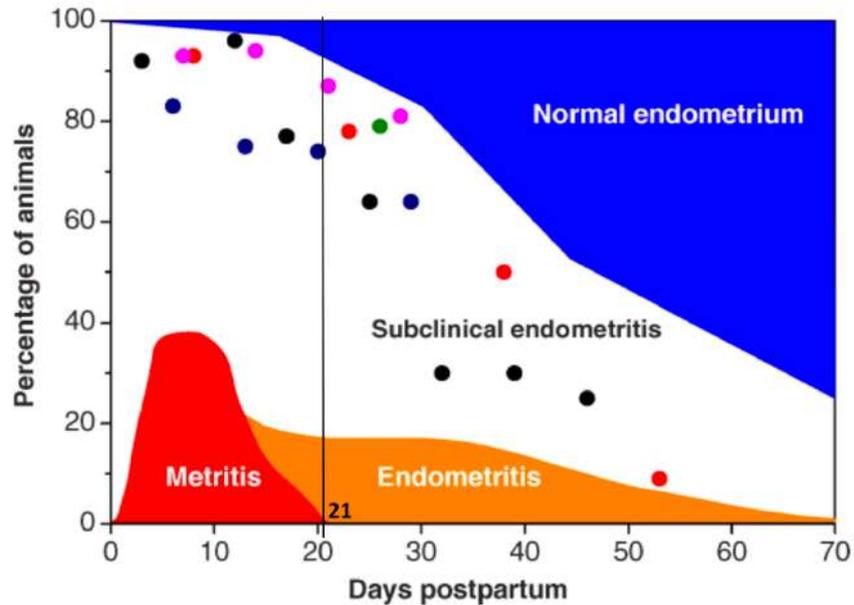


Fig. 8. Incidence de l'endométrite clinique et subclinique après le part. Le terme « endometritis » sur l'illustration est à entendre au sens d'endométrite clinique. Adapté de Sheldon (Sheldon et al., 2009).

La prévalence moyenne à l'échelle des troupeaux est extrêmement variable d'une étude à l'autre : une prévalence moyenne de 25,9% avec des valeurs extrêmes d'environ 5% et 50% est rapportée dans l'étude de Cheong (Cheong et al., 2011) (cf. Fig. 9), menée dans 38 troupeaux. Les résultats mentionnés dans les autres études sont obtenus à partir d'effectifs de troupeaux plus faibles : une prévalence moyenne sur six troupeaux de vaches laitières de 25% avec des valeurs comprises entre 20 et 30% (Dubuc et al., 2010a), une prévalence moyenne sur cinq troupeaux de vaches laitières de 52,8% avec des valeurs comprises entre 37 et 74% (Gilbert et al., 2005).

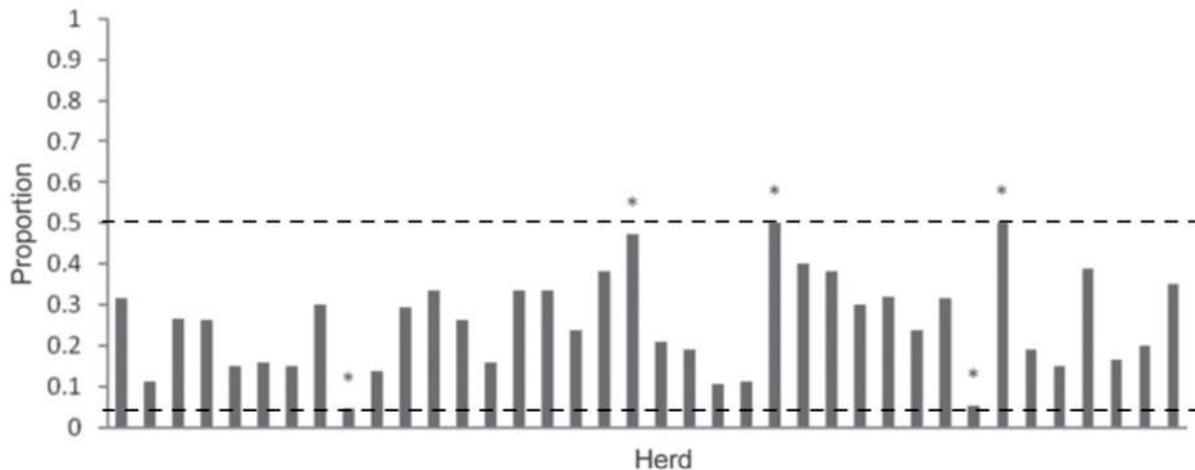


Fig. 9. Prévalence de l'endométrite subclinique à l'échelle des troupeaux (38 troupeaux). Légende : le symbole * signifie que pour un troupeau donné la prévalence diffère significativement de la moyenne de 25,9%. Adapté de Cheong (Cheong et al., 2011).

b) Facteurs de risque associés à l'endométrite cytologique

De même que la prévalence, les facteurs de risque identifiés dans les différentes études (cf. Tableau 2) dépendent eux aussi des critères retenus pour la définition de l'endométrite subclinique. Des événements liés au part, tels que la rétention des membranes fœtales, l'assistance au vêlage, le vêlage de jumeaux, le faible état corporel au vêlage (Dubuc et al., 2010b; Kasimanickam et al., 2004; Lee et al., 2018), ou encore la survenue d'une métrite aiguë (Cheong et al., 2011; Lee et al., 2018), la cétose postpartum (Cheong et al., 2011; Dubuc et al., 2010b), la parité (Pascottini et al., 2017), la concentration en haptoglobine postpartum (Dubuc et al., 2010b), une concentration élevée en acides gras non estérifiés avant le part (Hammon et al., 2006) augmentent le risque d'endométrite subclinique. De même que pour l'endométrite clinique, la rétention des membranes fœtales, l'assistance au vêlage (dystocie) et la gémellité favorisent la croissance bactérienne dans la lumière utérine et amplifient les lésions consécutives à un traumatisme utérin. A la différence de l'endométrite clinique (étude de Potter (Potter et al., 2010) pour laquelle les vaches primipares semblent plus à risque), la parité ne semble pas constituer un facteur de risque pour l'endométrite subclinique puisque les études ne montrent pas de différence significative de prévalence entre les vaches primipares et multipares (Gilbert et al., 2005).

Une note d'état corporel faible et la cétose sont deux facteurs de risque de l'endométrite subclinique (Cheong et al., 2011; Dubuc et al., 2010b). Ils sont le reflet du déficit énergétique

postpartum, dont on suppose qu'il a des conséquences sur la réponse immunitaire innée. En effet, un impact négatif d'une moindre disponibilité en glucose et/ou en glutamine sur la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (interleukin 1 beta), IL-6 (interleukin 6) et IL-8 (interleukin 8) en réponse à une stimulation par le LPS ou les lipopeptides bactériens d'explants d'endomètre en culture (*ex vivo*), a été démontré dans deux études récentes (Noletto et al., 2017; Turner et al., 2016). D'autre part les corps cétoniques notamment le β -hydroxybutyrate, présents lors de déficit énergétique et de cétose pourraient avoir un effet immunosuppresseur, sur les fonctions immunitaires innées lors d'endométrite, comme le suggère une étude étudiant l'action du β -hydroxybutyrate sur l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse innée des cellules épithéliales mammaires stimulées par *Escherichia coli* (Hillreiner et al., 2016).

Tableau 2. Facteurs de risque associés à l'endométrite subclinique à l'échelle individuelle

Facteur de risque	OR ou RR	95% IC	Références
Rétention placentaire (Rétention des membranes fœtales plus de 24h)	1,87*	1,05–3,314	(Lee et al., 2018)
Assistance au vêlage	3,15 à 3,18 fois plus à risque (OR ou RR non indiqués)	-	(Kasimanickam et al., 2004)
Vêlage de jumeaux			
Mérite	3,07*	1,622–5,827	(Lee et al., 2018)
	1,86*	1,05–3,30	(Cheong et al., 2011)
Cétose postpartum (Concentration en BHB >1,100 μ mol/L)	3,83*	1,82–8,07	(Cheong et al., 2011)
	1,41*	1,05–2,00	(Dubuc et al., 2010b)
BCS 3,0 à 3,5 à la mise-bas	0,53*	0,42–0,95	(Dubuc et al., 2010b)
BCS \geq 3,75 à la mise-bas	0,62	0,46–1,35	(Dubuc et al., 2010b)
Concentration sérique en haptoglobine dans la première semaine postpartum \geq 0,8 g/L	1,59*	1,12–2,27	(Dubuc et al., 2010b)

Légende. Le symbole * est apposé lorsque la p-value est inférieure à 0,05. IC : intervalle de confiance. OR : odds ratio. RR : risque relatif. BHB : beta-hydroxybutyrate.

La saison chaude (Pascottini et al., 2017) ou l'utilisation d'un box de vêlage (étude menée par Prunner (Prunner et al., 2014) sur 10 troupeaux de vaches laitières) ont été associés à une augmentation du risque d'endométrite subclinique. L'étude de Cheong (Cheong et al., 2011) portant sur 38 troupeaux de vaches laitières a identifié deux facteurs de risque associés à une augmentation de la prévalence de l'endométrite subclinique à l'échelle du troupeau : le logement en aire paillée au début du postpartum et l'utilisation d'une litière autre que la paille dans le box de vêlage. Dans le détail, la prévalence d'endométrite subclinique dans les troupeaux dont les vaches sont élevées en aire paillée en début de postpartum est de 36,1%, alors que celle déterminée dans les troupeaux avec des logettes à la même période est de 19,4%. Concernant le matériau utilisé dans le box de vêlage, la même étude rapporte une diminution de la prévalence inter-troupeaux de 10,7% lorsque la litière est constituée de paille.

B. Conséquences sur les performances de reproduction et de production

1. Performances de reproduction

L'endométrite par définition est associée à une baisse des performances de reproduction, quelle que soit la forme considérée – clinique ou subclinique – chez les vaches laitières (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006). Les études montrent notamment un effet sur les paramètres de fertilité et de fécondité comme suit :

- Une réduction du taux de réussite à la première insémination artificielle chez les vaches avec endométrite subclinique (Gilbert et al., 2005) et endométrite clinique (Toni et al., 2015) ;
- Une augmentation de l'intervalle vêlage – première insémination artificielle chez les vaches avec endométrite subclinique (Gilbert et al., 2005) ;
- Une réduction significative du taux de gestation à n jours postpartum (n variant d'une étude à l'autre) chez les vaches avec endométrite clinique ou subclinique *par rapport* aux vaches saines, en d'autres termes une réduction du risque relatif de gestation, la valeur du risque relatif variant selon les études (Dubuc et al., 2010a; Galvão et al., 2009; Gilbert et al., 2005; LeBlanc et al., 2002; Plöntzke et al., 2011) (cf. Tableau 3). L'étude de Gilbert (Gilbert et al., 2005) ne rapporte pas de valeur de risque relatif mais seulement un taux de gestation plus faible chez les vaches avec endométrite subclinique par rapport aux vaches sans inflammation. Cette réduction du taux de gestation chez les vaches atteintes par rapport aux vaches saines se traduit par un allongement de la

médiane de l'intervalle vêlage – insémination fécondante des vaches avec endométrite clinique ou subclinique par rapport aux vaches saines (Dubuc et al., 2012).

- Une augmentation significative du nombre d'inséminations artificielles nécessaires pour obtenir la gestation, quel que soit le type d'endométrite (Gilbert et al., 2005; Plöntzke et al., 2011)

En outre une augmentation du risque de réforme pour cause de mauvaises performances de reproduction est rapportée dans l'étude de Plöntzke (Plöntzke et al., 2011) lorsque le diagnostic est fait entre 18 et 38 jours postpartum (RR 1,57*, IC 95% 1,04 – 2,38). Ceci ne semble pas être valable lorsque l'endométrite clinique est diagnostiquée plus tardivement, à 56 ± 3 jours (Dubuc et al., 2011).

Tableau 3. Impact de l'endométrite sur le risque relatif de gestation.

Type d'endométrite	Période du diagnostic de l'endométrite (jpp)	Période sur laquelle est calculée le RR (jpp)	RR	IC 95%	Références
EC	18 à 38	360	0,49*	0,28 – 0,84	(Plöntzke et al., 2011)
	20 à 33	360	0,73*	0,64 – 0,84	(LeBlanc et al., 2002)
	32 à 38	200	0,64*	0,55 – 0,73	(Dubuc et al., 2010a)
ES			0,66*	0,56 – 0,77	
		35	300	0,7*	0,6 – 0,9

Légende. EC : endométrite clinique. ES : endométrite subclinique. jpp : jours postpartum. RR : risque relatif. IC : intervalle de confiance. Le symbole * est apposé lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Un retard du retour à la cyclicité mis en évidence par une étude est possiblement un des éléments expliquant l'impact de l'endométrite sur les performances de reproduction. Les vaches présentant une endométrite subclinique ont 1,5 fois plus de chances d'avoir une période anovulatoire prolongée que les vaches saines (Dubuc et al., 2012). Dans le détail, le pourcentage de vaches avec un repos ovarien prolongé en présence ou absence d'endométrite subclinique était respectivement de 18,5% et 13,1% (OR 1,52*, IC 95% 1,08 – 2,13).

La concentration en FSH (Follicle Stimulating Hormone) plasmatique augmente dans les premiers jours suivant le part permettant la croissance folliculaire et ainsi la reprise des vagues folliculaires (Crowe, 2008). Elle conduit à l'apparition du premier follicule dominant 7 à 10 jours après le vêlage. Ce premier follicule dominant pourra soit ovuler vers 15 jours postpartum et être à l'origine du premier corps jaune, soit subir une atresie laissant alors la place au développement d'un autre follicule dominant, soit devenir un kyste ovarien par croissance persistante et absence d'ovulation. Le devenir du premier follicule dominant, parmi les trois possibilités précédemment citées, dépend de la fréquence des pics sécrétoires de LH (Luteinising Hormone) (Roche et al., 1992) : la sécrétion pulsatile adéquate de LH est nécessaire au développement d'un follicule dominant ovulatoire. Les cytokines et les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) perturbent l'axe hypothalamo-hypophysaire provoquant une réduction de la sécrétion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) et de LH (Karsch et al., 2002), hormones dont la sécrétion pulsatile est indispensable à la formation des premiers follicules ovulatoires, comme détaillé précédemment. On peut supposer que les vaches développant une endométrite ont un profil cytokinique tel que, entre 1 et 2 semaines, le premier follicule dominant postpartum n'ovule pas par défaut d'une sécrétion pulsatile de LH adéquate, retardant ainsi l'apparition du premier corps jaune postpartum et donc le retour à la cyclicité de la vache. De la même manière, le profil cytokinique anormal associé à l'endométrite se maintenant au-delà de 1 à 2 semaines, on peut penser qu'il bloquera l'ovulation des follicules ovulatoires, retardant toujours plus le retour à la cyclicité. Deux autres mécanismes sont suggérés pour expliquer le retour retardé de la cyclicité ovarienne lors d'endométrite : les cytokines pro-inflammatoires, en particulier IL-6 et TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), produites en réponse à la présence de bactéries dans l'utérus et qui agissent directement sur l'ovaire et perturbent la genèse des follicules ovariens (Alpizar and Spicer, 1994; Spicer, 1998) ; les PAMPs agissent sur l'ovaire et limitent la production d'œstradiol par les cellules de la granulosa (Herath et al., 2007; Price et al., 2013) ; ce stéroïde est nécessaire à l'apparition du pic de LH par rétrocontrôle positif.

2. Performances de production

L'endométrite étant une affection localisée, aux faibles répercussions systémiques, il est probable qu'elle soit sans conséquence sur la production de lait. L'étude de Dubuc (Dubuc et al., 2011) est en accord avec cette hypothèse : l'endométrite, dans ses deux formes, n'a pas d'effet sur la quantité de lait produit.

III. Mécanismes physiopathologiques

A. Agents pathogènes impliqués dans la contamination utérine postpartum et dans l'infection de l'endomètre

1. Une colonisation permise par la perte d'étanchéité du col utérin et qui s'estompe dans le temps

L'étanchéité du col préserve l'utérus des contaminations microbiennes au cours de la gestation. Le processus de maturation du col de l'utérus provoque un relâchement progressif du myomètre cervical et permet, sous l'action conjointe des efforts expulsifs de la mère, le passage du fœtus et de ses annexes vers la cavité vaginale. La perte d'étanchéité du col utérin après la parturition rend possible la colonisation ascendante de l'utérus par des bactéries présentes dans le vagin (cf. Fig. 10). Cette colonisation bactérienne intra-utérine est quasiment systématique après le part. En effet, la prévalence des vaches dont l'utérus est contaminé atteint 80 à 100% dans les deux premières semaines postpartum (Chapwanya et al., 2012; Sheldon and Dobson, 2004). Cependant l'invasion bactérienne de l'utérus après le part ne conduit pas systématiquement à une endométrite, comme le suggèrent les études de la prévalence des endométrites clinique et subclinique, n'excédant pas, pour les deux catégories, 35% (Kasimanickam et al., 2004; Plöntzke et al., 2011) (cf. Annexe 1. **Tableau illustrant la multitude des valeurs de seuils retenus pour définir l'endométrite subclinique. Adapté de (de Boer et al., 2014).** et Annexe 2. **Tableau illustrant les prévalences de l'endométrite clinique selon les études.**).

Le rôle du pH vaginal et de la flore résidente du vagin dans la défense de l'utérus contre l'infection reste à éclaircir (Sheldon and Owens, 2017). Les peptides antimicrobiens, glycoprotéines et mucines présents dans le vagin et le col permettent de limiter la contamination de l'utérus et la croissance bactérienne (Chapwanya et al., 2012; Davies et al., 2008; Kasimanickam et al., 2014).

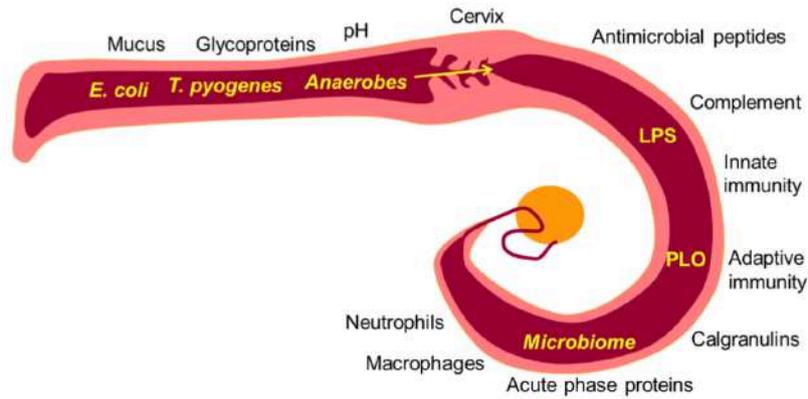


Fig. 10. La perte d'étanchéité du col utérin survenant lors de la parturition rend possible la colonisation ascendante de l'utérus par les bactéries présentes dans le vagin, principalement *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* et des bactéries anaérobies. Les glycoprotéines, peptides antimicrobiens et mucines présentes dans le vagin et le cervix limitent la croissance bactérienne et la colonisation de l'utérus. Le rôle joué par le pH et la flore vaginale résidente n'est pas clairement défini. Toutefois un grand nombre de bactéries atteint la lumière utérine provoquant via l'exposition des facteurs de virulence comme le LPS (Lipopolysaccharide) et la PLO (cholesterol-dependent cytolysin pyolysin) aux cellules hématopoïétiques et endométriales l'afflux de neutrophiles et de macrophages. Le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans la réponse à l'infection. (Sheldon and Owens, 2017)

Les bactéries sont éliminées de la lumière de l'utérus au cours des jours suivant le part (Sheldon, 2004) (cf. Fig. 11).

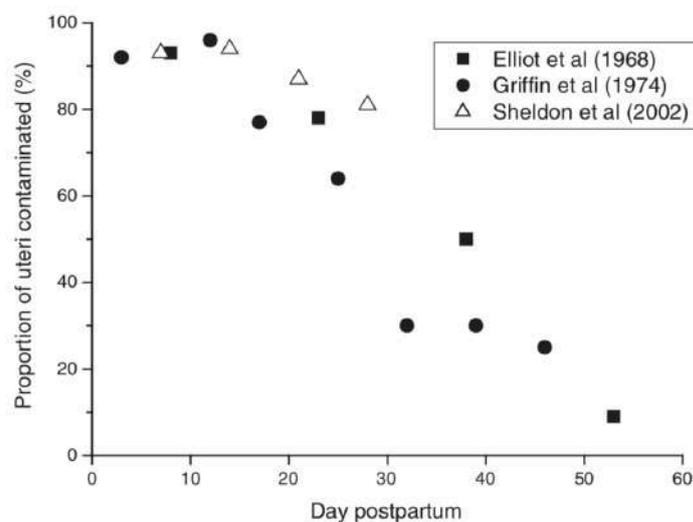


Fig. 11. Proportion de vaches dont l'utérus est contaminé par des bactéries après le part. (Sheldon, 2004)

2. Espèces bactériennes impliquées dans les infections utérines

Les espèces de bactéries qui ont été isolées ou identifiées à partir du contenu utérin sont nombreuses (cf. Fig. 12), et incluent des bactéries pathogènes opportunistes comme *Fusobacterium necrophorum*, *Trueperella pyogenes* et *Escherichia coli* d'importance majeure dans le développement de l'inflammation de l'endomètre (Sheldon et al., 2008, 2002b).

Bacterial category		
1	2	3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>Prevotella</i> spp	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Corynebacterium</i> spp
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Mannhiemia haemolytica</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Peptostreptococcus</i> spp	<i>Micrococcus</i> spp
	<i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase +)	<i>Providencia rettgeri</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Providencia stuartii</i>
		<i>Proteus</i> spp
		<i>Propionobacterium granulosa</i>
		<i>Staphylococcus</i> spp (coagulase -)
		α -Haemolytic Streptococci
		<i>Streptococcus acidominimus</i>

Fig. 12. Catégorisation des espèces de bactéries, isolées par cultures aérobie et anaérobie à partir d'écouvillons utérins de vaches, basée sur le pouvoir pathogène. Légende : 1, espèces connues pour causer des lésions de l'endomètre ; 2, espèces pathogènes pour l'utérus ; 3, espèces non pathogènes pour l'utérus. (Sheldon et al., 2002b)

3. Facteurs liés à l'agent infectieux et associés à la sévérité de l'endométrite

La sévérité de l'endométrite a été reliée à la présence de divers facteurs tenant à la nature de l'agent pathogène lui-même ou à sa quantité dans la lumière de l'utérus.

a) Le pouvoir pathogène

La présence de *Trueperella pyogenes* (anciennement désigné *Arcanobacterium pyogenes* dans la Fig. 12) augmente le risque d'endométrite clinique (Prunner et al., 2014). Cela pourrait être expliqué par l'action cytolytique – en particulier sur les cellules endométriales stromales plutôt que sur les cellules épithéliales ou immunitaires classiques (neutrophiles et macrophages) – du facteur de virulence PLO (cholesterol-dependent cytolysin pyolysin) qu'elle sécrète (Amos et al., 2014).

Karstrup (Karstrup et al., 2017) a évalué le pouvoir invasif, un des critères permettant d'évaluer le caractère pathogène plus ou moins marqué, et défini comme étant la capacité d'une bactérie pathogène à envahir un tissu à partir d'un foyer infectieux initial, par des bactéries d'intérêt majeur (sus-citées) dans l'endomètre de vaches à différents jours après le vêlage. *Fusobacterium necrophorum* envahit l'endomètre contrairement à *Trueperella pyogenes* et *Escherichia coli*, qui restent localisés dans la lumière utérine après adhésion ou non à la surface de l'épithélium. Le pouvoir invasif de *Fusobacterium necrophorum* pourrait toutefois résulter d'une synergie déjà connue avec *Trueperella pyogenes*, dont les toxines cytolytiques endommageraient le stroma de l'endomètre (Amos et al., 2014; Karstrup et al., 2017). Des souches d'*Escherichia coli* dites pathogènes pour l'endomètre (EnPEC pour Endometrial Pathogenic *E. coli*), différentes de celles responsables des infections mammaires, urinaires ou entériques, notamment en raison de l'absence de certains facteurs de virulence, ont été isolées de la lumière utérine. Contrairement aux résultats de l'étude de Karstrup (Karstrup et al., 2017), ces bactéries adhèrent puis envahissent l'épithélium et le stroma de l'endomètre (Sheldon et al., 2010). Le LPS d'*E. coli* est le principal facteur de virulence responsable de l'activation de l'immunité innée lors d'infection utérine (Sheldon et al., 2010).

b) Relation « dose – effet »

Le grade de l'endométrite a été associé à la concentration en bactéries pathogènes dans la lumière utérine (cf. Fig. 13). L'endométrite de grade 2 ou 3 selon l'échelle de Williams (Williams et al., 2005) est associée à un contenu utérin significativement plus riche en bactéries pathogènes que l'endométrite de grade 0 ou 1.

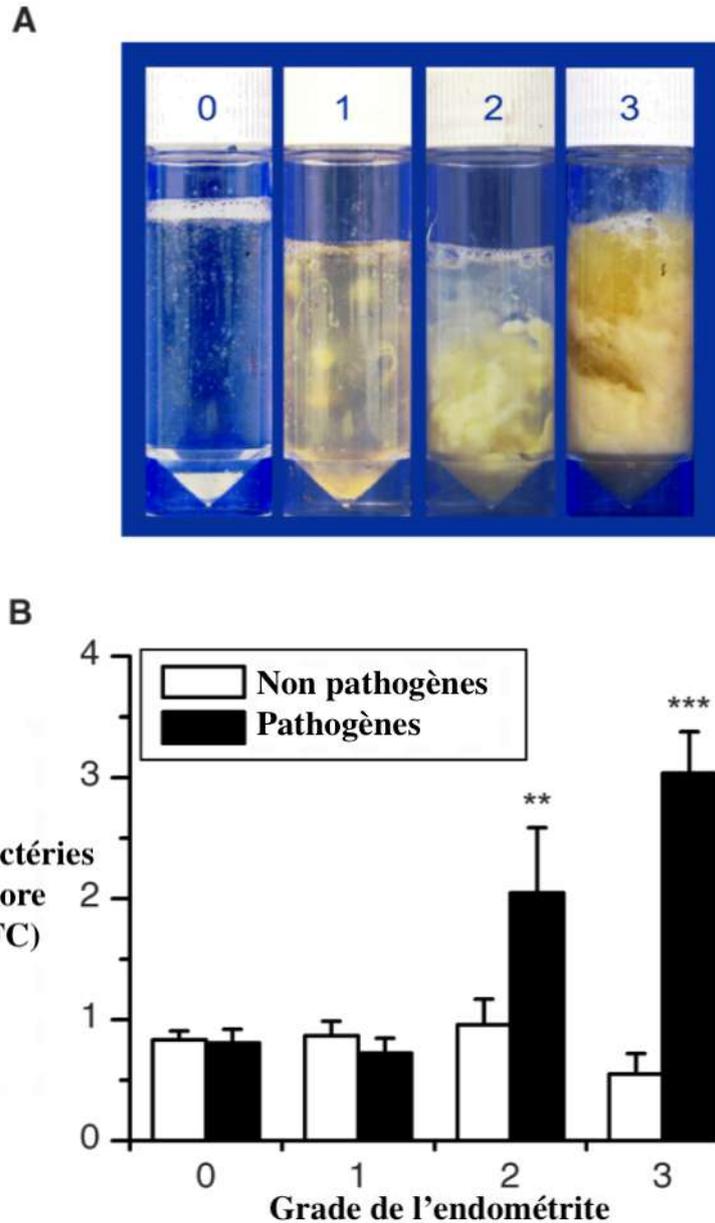


Fig. 13. Le grade de l'endométri clinique reflète le titre des bactéries pathogènes. (A) Evaluation du contenu vaginal. (B) Titre bactérien en fonction du grade de l'endométri clinique. Légende : Score UFC 0, aucune croissance ; score UFC 1, < 10 UFCs ; score UFC 2, 10 à 100 UFCs ; score UFC 3, 101 à 500 UFCs ; score UFC 4, > 500 UFCs. ** p -value < 0.01 et *** p -value < 0.001. (Williams et al., 2005)

B. Physiopathologie de la réponse immunitaire lors d'une infection de l'endomètre

La réponse immunitaire innée déclenchée par la détection des PAMPs et DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) fait généralement intervenir les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes neutrophiles (Moresco et al., 2011). Les cellules de l'endomètre expriment des récepteurs dits PRR (Pattern Recognition Receptors) ayant pour ligands les PAMPs des procaryotes et les DAMPs libérés par la lyse cellulaire, cette interaction initiant une cascade de transduction aboutissant à la production des médiateurs de l'inflammation.

1. Les cellules endométriales, acteur fondamental de la réponse immunitaire innée

a) Une réponse aboutissant à la synthèse de multiples médiateurs de l'inflammation

(1) Les cytokines et les chimiokines

(a) Une synthèse déclenchée par interaction entre LPS et TLR4

(i) La fixation du LPS au TLR4 aboutit à la synthèse de cytokines et de chimiokines

Les cellules stromales et les cellules épithéliales, qui forment l'endomètre bovin, présentent à leur surface des récepteurs PRRs parmi lesquels figurent TLR4 (Toll-like receptor 4) et CD14 (Herath et al., 2006). Les récepteurs TLR4 et CD14 ont pour ligand le LPS, constitutif de la paroi des bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, au contraire des bactéries à Gram positif telles que *Trueperella pyogenes*. L'expression de ces deux récepteurs membranaires est modulée par l'environnement péri-cellulaire (Herath et al., 2006). La stimulation des cellules endométriales par des bactéries à Gram négatif augmente l'expression de TLR4 et CD14. La fixation du LPS au complexe TLR4/CD14/MD2 déclenche la synthèse et la sécrétion de cytokines et chimiokines (Cronin et al., 2012) : les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (Cronin et al., 2012; Foley et al., 2015), IL-6 (Cronin et al., 2012; Herath et al., 2006), TNF α (Herath et al., 2006), ou anti-inflammatoires comme IL-10 (Foley et al.,

2015) et la chimiokine CxCL8 ou IL-8 (Cronin et al., 2012; Herath et al., 2006). La chimiokine IL-8 est responsable du recrutement des granulocytes neutrophiles et des macrophages dans l'utérus (Zerbe et al., 2003), qui sont ensuite activés par des cytokines dont l'IL-6 (Tizard, 2013).

(ii) *Voies de signalisation impliquées*

L'utilisation d'ARN interférents a permis de mettre en évidence le rôle central de la molécule de signalisation MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88) dans la transduction du signal initié par la formation du complexe LPS/TLR4/MD2 à la surface des cellules endométriales bovines et la production de cytokines et chimiokines (Cronin et al., 2012) (cf. Fig. 14). Leur étude précise également le rôle joué par les voies NFκB (Nuclear factor kappa B) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase). La formation du complexe LPS/TLR4/MD2 active la molécule intracellulaire MyD88, qui stimule alors les kinases IRAK4 et IRAK1 (IL-1R-associated kinases). Celles-ci activent la molécule TRAF6 (TNFR-associated factor 6) catalysant la formation du complexe formé par TAK1 (TGFβ-activated kinase 1) et des membres de la famille des protéines TAB (TAK1 binding protein). Ce complexe active deux voies importantes de l'inflammation, la voie MAP kinase et la voie NFκB. Les MAP kinases (MAPK) phosphorylées après stimulation des cellules endométriales par le LPS sont MAPK 3/1 (dites aussi ERK 1/2) et MAPK 14 (dites aussi p38). La cascade des MAPK (constituée de ERK 1/2, p38 et JNK) active le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1). Au sein de certaines cellules endométriales stromales, la voie NFκB est activée : le complexe formé par TAK1 et les protéines TAB provoque la dégradation de la protéine inhibitrice IKB (Inhibitor of nuclear factor kappa B) permettant la translocation nucléaire du facteur de transcription NFκB. Parmi les MAPK, seul le blocage de l'activité de MAPK 3/1 a pour effet la diminution de l'expression des gènes *il1b*, *il6* et *il8* soulignant leur rôle dans la transduction globale du signal.

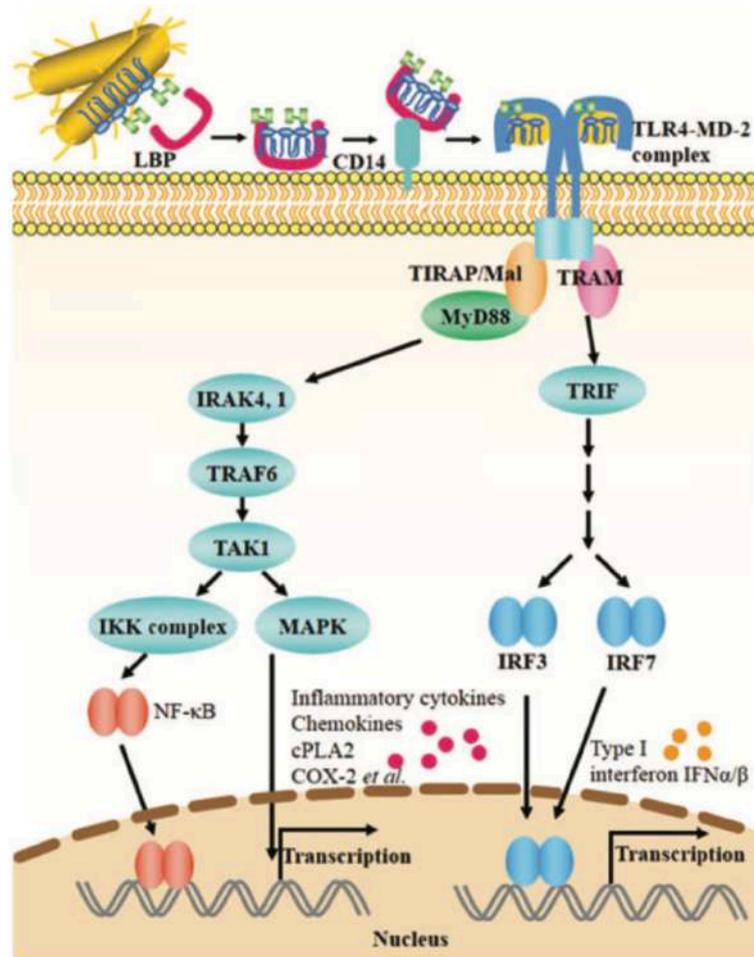


Fig. 14. La synthèse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires en réponse à la fixation du LPS bactérien à la surface des cellules endométriales est MyD88-dépendante. (Wang et al., 2015).

(b) ... ou résultant de l'interaction d'autres facteurs microbiens et de récepteurs TLR

Les cellules endométriales expriment d'autres TLRs, membranaires ou intracellulaires : les récepteurs TLR1 à 7 et TLR9 sont exprimés par les cellules épithéliales endométriales, TLR 1 à 4, 6, 7, 9 et 10 par les cellules stromales (Davies et al., 2008). L'ensemble de ces TLR, exception faite de TLR3, utilisent le système MyD88 pour la production des cytokines inflammatoires (Moresco et al., 2011).

Turner (Turner et al., 2014) met en évidence pour la première fois, via l'utilisation de l'interférence de l'ARN, l'implication d'autres récepteurs, précisément TLR1, 2 et 6, dans la réponse immunitaire innée des cellules endométriales aux lipopeptides bactériens. La fixation des lipopeptides triacylés sur les récepteurs TLR1 ou 2 aboutit à la synthèse d'IL-6 et d'IL-8

par les cellules endométriales. De même, la fixation des lipopeptides diacylés sur les récepteurs TLR1, 2 ou 6 provoque la synthèse d'IL-6 et d'IL-8. La transduction du signal initié par la fixation de lipopeptides tri- ou diacylés sur le récepteur TLR2 implique notamment la phosphorylation de p38 et ERK 1/2 ainsi que la translocation de NFκB (cf. Fig. 15). Ces résultats obtenus *in vitro* sont concordants avec ceux d'études menées *ex vivo* sur des cultures d'endomètre, montrant une accumulation de cytokines IL-8 et IL-6, ainsi que l'IL-1 en réponse à la présence de *Trueperella pyogenes* (Borges et al., 2012).

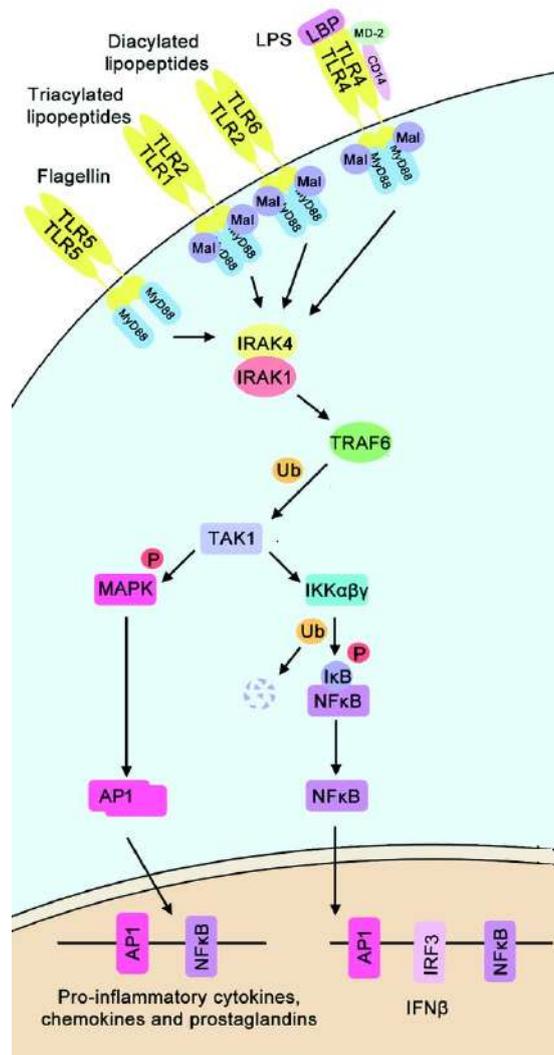


Fig. 15. La fixation du LPS ou des lipopeptides aux TLR des cellules endométriales aboutit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et prostaglandines. La transduction du signal implique le système MYD88 et l'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NFκB. (Sheldon et al., 2014)

(c) Une sécrétion de cytokines et de chimiokines polarisée

Les cellules épithéliales endométriales sécrètent la cytokine IL-6 vers la lumière utérine seulement, ce qui permet de limiter, dans l'espace, l'activation des cellules immunitaires attirées sur le site par l'IL-8 (Healy et al., 2015a). De même, il a été montré que la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales polarisées est dirigée principalement vers la lumière utérine lorsque la stimulation par le LPS se fait à l'apex des cellules (MacKintosh et al., 2013).

(d) Une sécrétion de cytokines amplifiée par la lyse des cellules endométriales

La lyse des cellules endométriales, notamment par l'action de la toxine PLO en présence de *T. pyogenes*, libère des composants intracellulaires, nucléaires et cytoplasmiques, appelés DAMPs qui sont reconnus par des PRRs, l'interaction DAMP-PRR provoquant *in fine* la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (Kono and Rock, 2008). L'IL-1 α (Interleukin-1 alpha) est l'un de ces DAMPs (Healy et al., 2015b). En effet, elle est présente dans le cytosol des cellules endométriales, et en réponse à la stimulation par le LPS, elle est libérée dans le compartiment extracellulaire lors de la lyse des cellules ; elle se fixe alors sur son récepteur IL1R (Interleukin 1 receptor) présent à la surface des cellules stromales et amplifie la sécrétion d'IL-6 qui a des propriétés pro-inflammatoires.

(e) Infection à *T. pyogenes* et activation de l'inflammasome

Les pores formés dans la membrane plasmique des cellules endométriales par les toxines PLO de *T. pyogenes* provoquent des flux d'ions entre la cellule et son environnement capables d'activer des complexes protéiques cytosoliques appelés inflammasomes. Les inflammasomes sont en général activés après stimulation des PRRs intracellulaires par les PAMPs qui diffusent dans le compartiment intracellulaire. L'activation de ces complexes protéiques cytosoliques conduit au clivage du précurseur de l'IL-1 β , ce qui permet aux cellules endométriales et hématopoïétiques de sécréter l'IL-1 β fonctionnelle (Lamkanfi and Dixit, 2014).

(f) Effet des hormones stéroïdes sur la synthèse de cytokines et de chimiokines par l'endomètre ?

Une étude récente menée *in vitro* montre que les hormones stéroïdes, œstradiol ou progestérone, n'ont aucun effet modulateur sur l'expression et la sécrétion des cytokines IL-1 β , IL-6 et IL-8 par les cellules de l'endomètre bovin et les cellules mononucléées sanguines lors de la stimulation avec du LPS (Saut et al., 2014). De même, le stade du cycle ovarien n'a aucune influence sur l'expression ou la synthèse de cytokines et de chimiokines lors de stimulation par du LPS ou la bactérie *Escherichia coli*. Ainsi et contrairement aux résultats de nombreuses autres études, les hormones stéroïdes ne semblent pas avoir d'effet sur la synthèse de ces médiateurs (Saut et al., 2014).

(2) L'interféron de type I, IFN β

La production d'interféron β (=IFN β) ne fait pas intervenir la signalisation MyD88 (cf. Fig. 14). La fixation du LPS au récepteur TLR4 aboutit à la dimérisation de IRF3, qui agit comme facteur de transcription pour les gènes codant l'IFN β , en association avec le facteur nucléaire NF κ B, après sa translocation nucléaire. L'IFN β peut avoir des conséquences bénéfiques ou défavorables pour l'hôte lors d'infection bactérienne (Kovarik et al., 2016). Son (ou ses) rôle(s) lors d'endométrite à *Escherichia coli* ou *Trueperella pyogenes* n'est (ne sont) pas élucidé(s).

(3) Les prostaglandines pro-inflammatoires

Les prostaglandines peuvent être produites par plusieurs types cellulaires, notamment les leucocytes en réponse à une stimulation (Harris et al., 2002). Les cellules endométriales utérines sont aussi capables de cette synthèse.

(a) La fixation du LPS au TLR4 aboutit à la synthèse de PGE2 et PGF2 α

Plusieurs études montrent la production de prostaglandines PGE2 et PGF2 α par les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre après stimulation par le LPS (étude *ex vivo* de Sheldon (Sheldon et al., 2014) et études *in vitro* de Herath (Herath et al., 2009, 2006) qui mettent en évidence par ailleurs une accumulation préférentielle de PGE2 aussi bien dans les cellules épithéliales que stromales. Enfin, l'étude *in vitro* de MacKintosh (MacKintosh et al., 2013) montre une accumulation proportionnelle à la concentration de LPS).

(b) Rôle des prostaglandines dans l'immunité innée utérine

La prostaglandine PGE2 produite par les cellules endométriales agit de façon paracrine sur les cellules endométriales via les récepteurs EP2 (E prostanoid receptor 2) et EP4 (E prostanoid receptor 4) (Herath et al., 2009) et sur les autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée. Elle pourrait avoir un rôle dans le contrôle de l'inflammation comme le suggèrent les nombreuses études portant sur l'effet de PGE2 sur les fonctions des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée, dans et à la surface des muqueuses. En outre, PGE2 inhibe la phagocytose par les macrophages ainsi que le recrutement et l'activation des granulocytes neutrophiles et des cellules NK (Natural Killer) (Agard et al., 2013). D'autre part, elles limitent l'expression de certains gènes pro-inflammatoires dépendant de la voie MyD88 – comme *tnfa* et *ill* – et d'autres ne dépendant pas du système MyD88 – comme celui codant l'IFN β – dans les macrophages de la souris après stimulation par le LPS (Brandwein, 1986; Xu et al., 2008). Enfin, en favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires, elle modifie la réponse adaptative, en l'orientant vers un profil de type Th2 (T helper 2) (Agard et al., 2013).

La prostaglandine PGF2 α stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et favoriseraient la production de leucotriènes B4, laquelle stimule diverses fonctions exercées par les granulocytes neutrophiles (Lewis, 2004).

(c) Influence des hormones stéroïdes

La présence d'hormones stéroïdes, œstradiol et/ou progestérone, limite la surexpression des prostaglandines, PGE2 et PGF2 α , par les cellules endométriales stimulées par le LPS et cet effet est plus marqué sous imprégnation progestéronique (Herath et al., 2006). Il est cependant difficile de déterminer la résultante de la somme des effets de PGE2, dont l'effet est plutôt anti-inflammatoire, et PGF2, à l'inverse plutôt pro-inflammatoire, *in vivo* lors d'infection de l'endomètre en présence de progestérone ; plusieurs études démontrent une augmentation de la prédisposition aux infections sous imprégnation progestéronique (Kaushic et al., 2000; Lewis, 2004, 2003) (la progestérone module la synthèse de prostaglandines mais également d'autres acteurs de l'inflammation).

(4) Les peptides antimicrobiens et les mucines : synthèse par l'endomètre et rôle dans l'immunité innée locale

(a) Les peptides antimicrobiens

(i) *Rôle dans l'immunité innée*

Les peptides antimicrobiens sont connus pour jouer un rôle dans la réponse immunitaire innée. Les cellules de l'endomètre bovin expriment de manière constitutive des peptides antimicrobiens : les cellules épithéliales produisent les molécules LAP (Lingual Antimicrobial Peptide), TAP (Tracheal Antimicrobial Peptide) et les β -défensines BNBD4 et DEFB5 ; les cellules stromales ne produisent que LAP et TAP. La stimulation *in vitro* de cellules épithéliales avec du LPS provoque une surexpression des gènes codant les peptides antimicrobiens LAP et TAP, ce qui laisse à penser qu'ils ont une importance fonctionnelle dans la réponse immunitaire innée locale (Chapwanya et al., 2013; Davies et al., 2008).

(ii) *Influence des hormones stéroïdes*

En l'absence de stimulation par le LPS, la progestérone ne semble pas avoir d'impact sur l'expression des peptides antimicrobiens, ni sur les cellules stromales, ni sur les cellules épithéliales (Davies et al., 2008). L'impact de l'hormone n'a pas été testé dans un contexte de stimulation.

(b) La mucine MUC-1

(i) *Rôle dans l'immunité innée*

La mucine MUC-1 (Mucin-1) est une protéine transmembranaire glycosylée qui est exprimée à la surface des cellules épithéliales de l'endomètre bovin et ovin (Brayman et al., 2004; Davies et al., 2008; Johnson et al., 2001), et qui est capable entre autres d'empêcher l'adhésion des agents pathogènes à la surface des cellules de l'endomètre (Brayman et al., 2004). Elle est surexprimée *in vitro* par les cellules épithéliales de l'endomètre bovin lors de la stimulation par du LPS (Davies et al., 2008), ce qui suggère qu'elle est un acteur de la réponse immunitaire innée.

(ii) *Influence des hormones stéroïdes*

L'expression de MUC-1 est réduite sous imprégnation progestéronique, mais la progestérone ne semble pas moduler la surexpression de la mucine par les cellules épithéliales soumises à une stimulation par du LPS (Davies et al., 2008).

(5) Les protéines de la phase aiguë

La réponse à l'infection de l'endomètre par des bactéries fait probablement intervenir des protéines de la phase aiguë. Les concentrations plasmatiques de l'haptoglobine et de la SAA (serum amyloid A) sont augmentées lors de l'infection utérine par des bactéries (Williams et al., 2007) ; elles sont produites par le foie en réponse à des cytokines comme l'IL-6 libérée par l'endomètre (Sheldon et al., 2001). Dans l'étude de Chapwanya (Chapwanya et al., 2013) les gènes codant l'haptoglobine et la SAA3 sont surexprimés dans les cellules endométriales épithéliales soumises *in vitro* à une stimulation par du LPS. Les protéines codées par ces gènes, si elles sont sécrétées par l'endomètre, pourraient à la lumière de ces résultats assurer une protection locale, liée à leur effet antimicrobien et activateur des macrophages (Sheldon, 2015). L'importance de cette protection doit cependant être évaluée *in vivo*. Ces résultats sont discordants avec ceux mentionnés quelques années plus tôt dans l'étude de Davies (Davies et al., 2008), bien que portant sur des variables différentes (expression des gènes d'une part et concentration en protéines d'autre part), dans laquelle les concentrations en protéines haptoglobine et SAA dans les cellules endométriales ne sont pas modifiées par une stimulation *in vitro* avec du LPS.

b) *La réponse immunitaire innée est initiée précocement*

L'inflammation sévère après 15 jours postpartum, caractérisée histologiquement par une forte infiltration leucocytaire de l'endomètre de vaches primipares saines, commence à diminuer vers 30 jours postpartum avant de se résoudre totalement vers 60 jours postpartum (Chapwanya et al., 2012). Des biopsies de la paroi de l'utérus réalisées sur des vaches environ deux semaines après le part montrent une forte expression des gènes codant le récepteur TLR4 et des gènes codant les médiateurs de l'inflammation NFκB, IL1A, IL6, IL8, IL12A, TNF, SAA3, HP (Haptoglobine) et TAP (Chapwanya et al., 2012, 2009). A 30 jours postpartum, l'expression de ces gènes commence à retrouver un niveau basal (Chapwanya et al., 2012). Ces résultats sont confortés par l'étude de Foley (Foley et al., 2015) montrant une forte expression

des gènes impliqués dans l'inflammation au cours de la première semaine chez toutes les vaches (Foley et al., 2015).

Le système immunitaire inné est activé rapidement après exposition à du LPS, comme le révèle une étude *in vitro* dans laquelle les gènes codant les cytokines IL-1, IL-6, TNF α et la chimiokine IL-8 sont surexprimés dans les cellules endométriales, qu'elles soient épithéliales ou stromales, en l'espace de quelques heures après la stimulation (Cronin et al., 2012).

La figure suivante illustre la réponse de l'endomètre lors d'infection intra-utérine (cf. Fig. 16).

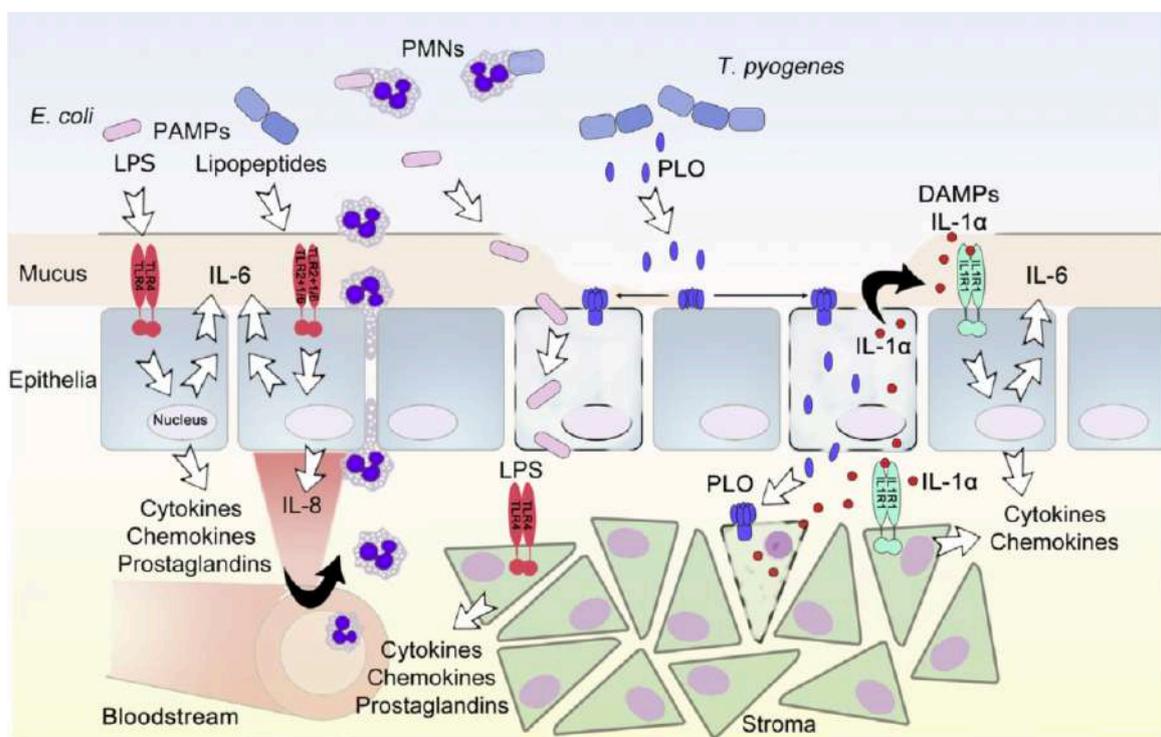


Fig. 16. La lumière de l'utérus est colonisée après le vêlage par de nombreuses espèces bactériennes, Escherichia coli et Trueperella pyogenes étant les plus fréquentes parmi les bactéries pathogènes. Elles sont reconnues par les cellules de l'immunité innée classiques mais aussi et surtout par les TLR exprimés à la surface des cellules endométriales, et provoquent in fine la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1, IL-6 et IL-8. Ces cytokines recrutent et activent les agents de la phagocytose, neutrophiles et macrophages, sur le site de l'infection. Trueperella pyogenes libère le facteur de virulence PLO responsable de la cytolysse du stroma endométrial essentiellement. (Carneiro et al., 2016)

2. Rôle de l'immunité adaptative dans la physiopathologie de l'endométrite ?

Le rôle joué par l'immunité adaptative dans la réponse à l'infection de l'endomètre n'est pas clair. L'endomètre postpartum contient des aires riches en lymphocytes, toutes localisées dans le stroma (Bonnett et al., 1991). Une étude récente a montré l'effet de la vaccination, à partir de formulations contenant différentes combinaisons de protéines bactériennes exprimées par *E. coli*, *F. necrophorum* et *T. pyogenes* et/ou les mêmes bactéries entières tuées, dans la prévention des métrites puerpérales chez la vache laitière (Machado et al., 2014). En revanche la vaccination n'a aucun effet autant sur la prévention des endométrites cliniques, dont le diagnostic est fait dans cette étude à 35 ± 3 jours postpartum par inspection visuelle du lavage utérin, que sur la contamination bactérienne intra-utérine. La vaccination réalisée avant le vêlage provoque une augmentation du titre des IgG (Immunoglobulines gamma) sériques spécifiques des antigènes, laquelle contribue sans doute à une meilleure réponse de l'organisme vis-à-vis de la métrite. Enfin, cette étude suggère que la présence d'immunoglobulines IgG spécifiques des agents pathogènes dont le rôle est avéré dans l'endométrite *dans la première semaine postpartum* (le titre des IgG n'étant plus mesuré au-delà dans cette étude) a une faible contribution sur le contrôle des infections utérines et l'inflammation qui s'ensuit.

3. Caractéristiques de la réponse lors d'endométrite

a) *Le profil cytokinique pro-inflammatoire est exagéré de manière précoce et persistante lors d'endométrite*

(1) Mise en évidence expérimentale

Le profil d'expression des gènes a été comparé dans diverses études entre les vaches développant une endométrite (clinique ou subclinique) et celles sans endométrite. Les résultats montrent que la réponse inflammatoire est exagérée précocement chez les vaches développant par la suite une endométrite, et elle se poursuit dans le temps contrairement aux vaches saines retrouvant dès 21 jours un profil non inflammatoire.

- Durant la première semaine postpartum, les vaches qui développent par la suite une endométrite surexpriment IL1A, IL1B – sous-exprimés dans l'étude de Galvão (Galvão et al., 2011) –, IL1R2 (Interleukin 1 receptor type 2) et TLR4 (étude *in vivo* de Herath (Herath et al., 2009), menée à partir de biopsies de la paroi de l'utérus), tandis que TNF α est sous-exprimé (Galvão et al., 2011). Une autre étude menée *in vivo* montre une surexpression des gènes *il1b*, *il6* et *il17a* à une semaine postpartum chez les vaches développant une

endométrite subclinique par rapport aux vaches qui resteront sans inflammation utérine (étude *in vivo* de Foley (Foley et al., 2015), menée à partir de biopsies de la paroi de l'utérus).

- A 21 jours postpartum, les gènes *illa*, *illb*, *il6* et *ill7a* sont surexprimés chez les vaches avec endométrite subclinique par rapport aux vaches sans inflammation de l'utérus (Foley et al., 2015). Cette surexpression concerne également le gène codant IL1R2 et la cytokine anti-inflammatoire IL-10.
- Entre 3 et 4 semaines postpartum, les cellules endométriales des vaches atteintes d'endométrite surexpriment les gènes codant CXCL5 (C-X-C motif chemokine ligand 5), IL-1B, IL-8 et TNF α (étude de Fischer (Fischer et al., 2010), menée *in vivo*).
- Enfin entre 5 et 7 semaines postpartum, les gènes codant IL-1B, IL-6 et IL-8 sont encore fortement exprimés (étude de Galvão (Galvão et al., 2011), menée *in vivo*). Ces résultats sont confortés par ceux d'une autre étude montrant une surexpression des gènes codant CXCL5, IL-1B, IL-6, IL-8 et TNF α *in vivo* de 10 à 45 jours postpartum chez les vaches primipares atteintes d'endométrite par rapport aux vaches sans endométrite (Gabler et al., 2010).

Les endométrites clinique et subclinique se différencient notamment par le profil d'expression du gène *il8* : il est surexprimé chez les vaches avec endométrite clinique par rapport aux vaches sans endométrite et il est exprimé au même niveau chez les vaches sans endométrite et chez celles avec une endométrite subclinique. En effet, une étude menée *in vivo*, à partir d'échantillons collectés par cytobrosse, montre une surexpression des gènes codant TLR4, IL1B, IL8 et TNF α chez les vaches avec endométrite clinique par rapport aux vaches sans endométrite; chez les vaches avec endométrite subclinique, seuls les gènes codant IL-1B et TNF α sont surexprimés par rapport aux vaches sans endométrite, aucune différence n'étant observée dans l'expression des gènes codant IL-8 et TLR4 (Kasimanickam et al., 2014). L'IL-8 étant responsable de la chimiotaxie des cellules immunitaires, en particulier des neutrophiles, sur le site de l'infection, sa surexpression explique probablement l'accumulation majeure de neutrophiles et la formation de pus chez les vaches avec une endométrite clinique.

Ces études révèlent d'une part que l'endomètre des vaches atteintes d'endométrite (quel que soit le type d'endométrite) est caractérisé par un profil pro-inflammatoire plus marqué que celui des vaches sans endométrite, de manière précoce (au moins dès la première semaine

postpartum). Au fil du temps (plus précisément entre 7 et 21 jours), chez les vaches qui n'auront pas d'endométrite ultérieurement, l'endomètre retrouve un état non inflammatoire tandis que chez des vaches atteintes d'endométrite, il est caractérisé par une persistance de la réponse inflammatoire. De plus, les endométrites clinique et subclinique se différencient par le profil d'expression du gène *il8* : il est surexprimé chez les vaches avec endométrite clinique par rapport aux vaches sans endométrite et exprimé au même niveau que les vaches sans endométrite chez celles avec une endométrite subclinique.

(2) Mécanismes mis en évidence

(a) STAT3 et surexpression des gènes *il6* et *il8*

Cronin (Cronin et al., 2016) a mis en évidence, dans une étude conduite *in vitro* sur des cellules endométriales stromales bovines, l'existence d'une interaction entre les voies de signalisation TLR4 et STAT3 (Signal Transducers and Activators of the Transcription 3). L'inhibition de stat3 par la technique d'interférence de l'ARN bloque la production d'IL-6 et IL-8 qui dépend de l'activation du TLR4, illustrant de fait l'activation nécessaire du facteur STAT3 pour la production de ces cytokines. Cette étude révèle surtout l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif impliquant IL-6 et STAT3 (Fig. 17). L'exposition aiguë à du LPS conduit à l'activation des voies de signalisation impliquant le facteur nucléaire NFκB et les MAPK (détail dans les paragraphes précédents), qui aboutit à la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 et qui inhibe parallèlement, par blocage de la phosphorylation du résidu tyrosine, l'action du facteur de transcription STAT3. L'IL-6 sécrétée par les cellules endométriales stromales se fixe sur son récepteur IL6R présent sur ces mêmes cellules (effet autocrine), activant alors la phosphorylation de STAT3. Les dimères de STAT3 formés agissent, après translocation nucléaire, comme facteurs de transcription induisant l'expression des gènes codant IL-6 et IL-8 qui permettent par chimiotaxie le recrutement des granulocytes neutrophiles sur le site de l'infection. Cette boucle de rétrocontrôle positif maintient, en l'absence de bactéries, le recrutement des neutrophiles.

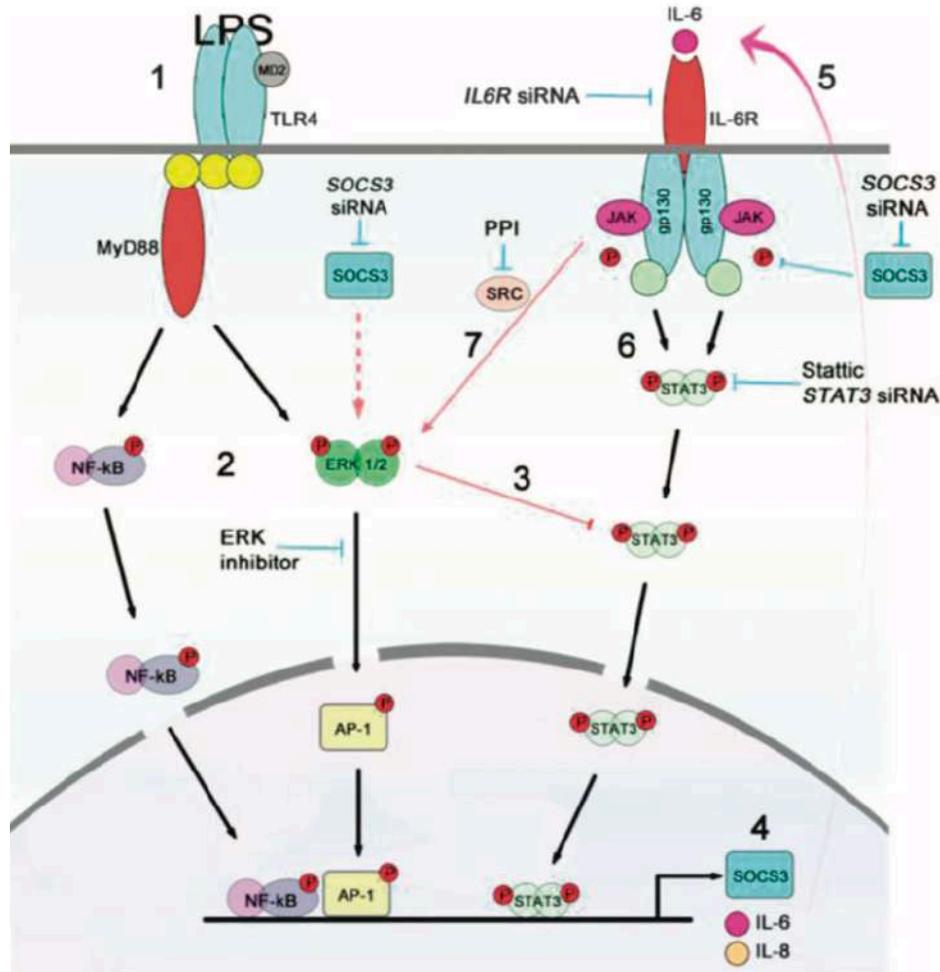


Fig. 17. Une boucle de rétrocontrôle positif impliquant IL-6 et le facteur de transcription STAT3 entretient la production d'IL-8 par des cellules endométriales soumises à une exposition prolongée au LPS. (Cronin et al., 2016)

b) Une réponse adaptative cellulaire modifiée chez les vaches avec endométrite subclinique

(1) Les lymphocytes B

Lors d'endométrite subclinique, entre 45 et 55 jours postpartum, la concentration sanguine des lymphocytes B est significativement plus élevée (Düvel et al., 2014), ce qui semble être le cas aussi à 65 jours postpartum (Brodzki et al., 2014), bien que la tendance observée ne puisse pas être généralisée. Il reste néanmoins à déterminer le lien entre la présence accrue de lymphocytes B dans la circulation sanguine et la physiopathologie de l'endométrite (Düvel et al., 2014). En revanche les lymphocytes B sont en concentration bien plus faible dans

la lumière utérine des vaches avec endométrite comparées aux vaches sans endométrite (Brodzki et al., 2014).

(2) L'endométrite est associée à une plus grande quantité de lymphocytes T CD8⁺ et une plus faible quantité de lymphocytes T CD4⁺ et T_{reg} dans la lumière utérine

La concentration sanguine, de lymphocytes T $\alpha\beta$ (lymphocytes CD8⁺ et lymphocytes CD4⁺), de lymphocytes T_{reg} (CD4⁺ CD25⁺), et des lymphocytes T $\gamma\delta$ n'est pas significativement différente lors d'endométrite subclinique, entre 45 et 55 jours postpartum (Düvel et al., 2014), contrairement à la concentration des lymphocytes B. À 65 jours postpartum, la concentration de lymphocytes CD4⁺ et de lymphocytes T_{reg} est plus faible dans le sang des vaches atteintes d'endométrite subclinique par rapport aux vaches sans inflammation de l'endomètre (Brodzki et al., 2014). Des lavages utérins réalisés dans la même étude révèlent d'une part une moindre concentration de lymphocytes CD4⁺ et de lymphocytes T_{reg}, et d'autre part la présence accrue de lymphocytes CD8⁺ chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique. Les lymphocytes T_{reg} produisent des cytokines immunomodulatrices dont l'IL-10, laquelle inhibe les deux types de réponse immunitaire, innée et adaptative.

C. Rôle du fond génétique dans la réponse immunitaire et possibles effets de la sélection génétique pour certains caractères de la réponse immunitaire

1. Le contrôle génétique de la prédisposition à l'endométrite est actuellement inconnu

La connaissance des gènes qui participent de façon significative à la variabilité de la réponse immunitaire lors d'une infection utérine, en particulier de l'endomètre, chez la vache est actuellement limitée. Une faible association semble exister entre le polymorphisme des gènes *tlr2*, *4*, *6* et *9* et la variabilité du statut inflammatoire chez la vache laitière, en d'autres termes le polymorphisme des gènes *tlr2*, *4*, *6* et *9* n'a que peu d'effet sur l'incidence de l'endométrite et donc sur la résistance à l'endométrite (Pinedo et al., 2013).

2. Possibles effets de la sélection génétique pour la résistance aux mammites sur la réponse immunitaire lors d'infection utérine postpartum

a) *La sélection génétique pour la résistance aux mammites sur le critère CCS dans le lait modélisée par la production de lignées divergentes*

- (1) Production de deux lignées divergentes sur le critère CCS pour connaître les effets de la sélection génétique sur le critère de résistance aux mammites

La sélection divergente sur le critère CCS (concentration de cellules somatiques) effectuée sur des brebis laitières de race Lacaune a permis à l'équipe conduite par Rupp (Rupp et al., 2009) d'étudier les effets de la sélection basée sur ce critère sur le caractère de résistance aux infections intramammaires. Cette sélection a permis d'obtenir deux lignées de brebis issues de béliers aux index CCS extrêmes : la lignée dite CCS+ est constituée de brebis issues de béliers dont l'index CCS est positif, et la lignée CCS- constituée de brebis issues de béliers dont l'index CCS est extrêmement négatif et donc défavorable pour ce caractère. Des lignées divergentes sur ce même critère ont de la même manière été obtenues dans l'espèce bovine et caprine. Des études de terrain et expérimentales sur les animaux issus de ces sélections ont permis d'observer des différences à l'échelle épidémio-clinique (incidence des infections intramammaires ou encore incidence des mammites cliniques et subcliniques), cellulaire (cellules somatiques du lait, cellules épithéliales mammaires) et enfin génétiques (profils d'expression génique).

Dans l'étude de Rupp (Rupp et al., 2009), les cas de mammites cliniques suraiguës ou subaiguës (fièvre, abattement, anorexie, signes locaux tels qu'une modification de la couleur et/ou de la consistance du lait ou la présence de mamelles chaudes, douloureuses et œdématisées) n'ont été observés que dans la lignée CCS+ et la prévalence des mammites cliniques chroniques (diagnostiquées dans cette étude par la présence d'abcès parenchymaux) est largement supérieure chez les brebis de la lignée CCS+. L'incidence des examens bactériologiques positifs réalisés au moment de l'agnelage, sur le colostrum, ainsi que pendant la lactation, par échantillonnage mensuel du lait, est supérieure chez les brebis de la lignée CCS+ comparée à celle observée chez les brebis de la lignée CCS- (Rupp et al., 2009). Ce résultat est conforté par celui d'une autre étude menée sur des chèvres laitières de race Alpine obtenues par sélection divergente sur le critère CCS qui révèle que l'incidence des infections intramammaires est plus faible dans la lignée CCS-, dans des conditions naturelles (Caillat et al., 2011), tandis qu'aucune

différence concernant le titre bactériologique n'apparaît dans des conditions expérimentales (Cremonesi et al., 2012). Dans l'étude de Rupp (Rupp et al., 2009) les concentrations de cellules somatiques dans le lait divergent entre les deux lignées à partir de l'agnelage (valeurs basales similaires dans le colostrum) jusqu'à la fin de la lactation : elles sont supérieures chez les brebis de la lignée CCS+, en corrélation avec la plus forte prévalence d'infections intramammaires caractérisant cette lignée. Les mêmes observations sont rapportées dans l'espèce caprine dans des conditions de terrain (Huau et al., 2015). En revanche il n'existe aucune différence de concentration de cellules somatiques entre deux lignées divergentes de chèvres dans des conditions expérimentales (Cremonesi et al., 2012).

Dans l'étude expérimentale de Bonnefont (Bonnefont et al., 2011) menée sur des brebis en lactation issues de la sélection divergente de Rupp (Rupp et al., 2009) et soumises à une inoculation par *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermis*, le titre bactériologique dans le lait prélevé 48 heures après inoculation est inférieur chez les brebis CCS-, la concentration de cellules somatiques étant similaire entre les deux lignées au moment de l'épreuve infectieuse et 48 heures après ; cela suggère une meilleure activité bactéricide des cellules exposées à l'agent infectieux. L'effet de la sélection génétique sur le critère CCS sur les fonctions immunitaires des cellules mammaires épithéliales, acteurs indispensables de la réponse aux infections intramammaires, comme résumé dans l'article de Rainard (Rainard et al., 2018), a été étudié dans plusieurs études et les résultats sont divergents. Aucun effet n'est mis en évidence dans l'étude de Bonnefont (Bonnefont et al., 2012), dans laquelle des cellules épithéliales, isolées de glandes mammaires de brebis issues des deux lignées divergentes décrites par Rupp, ont été exposées *in vitro* à l'agent pathogène majeur *Staphylococcus aureus*. En revanche dans l'étude de Brand (Brand et al., 2011), les cellules épithéliales isolées de glandes mammaires de vaches résistantes (sélectionnées sur le critère CCS) sont clairement plus réactives à la stimulation par *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* que celles provenant de vaches sensibles ; ce résultat est en faveur d'une implication des cellules épithéliales mammaires dans la résistance aux mammites.

Enfin, des études révèlent des différences d'expression de gènes impliqués dans les différentes voies de la réponse immunitaire entre les lignées résistantes et sensibles aux mammites. L'étude de Toufeer (Toufeer et al., 2011) met en évidence, dans les cellules dendritiques des animaux résistants aux mammites, une surexpression des gènes *ido1*, gène qui participe au contrôle de la réponse inflammatoire par stimulation de la différenciation de

lymphocytes T_{reg} et limitation de la production de cellules NK et d'interférons (Katz et al., 2008; Liu et al., 2010). Les cellules dendritiques des animaux sensibles sont le siège d'une surexpression des gènes *myd88* et *ilrap*, impliqués dans la cascade de signalisation intracellulaire IL-1R/MyD88, activée notamment par l'IL-1B. Dans l'étude de Brand (Brand et al., 2011), les gènes *il1b* et *il8* sont surexprimés de manière précoce chez les vaches résistantes, ce qui pourrait permettre une élimination plus rapide de l'agent pathogène ; chez les animaux sensibles, l'expression de ces deux gènes est plus tardive et bien moindre. Dans l'étude de Bonnefont, le niveau d'expression de ces deux gènes ne diffère pas d'une lignée à l'autre (Bonnefont et al., 2011). En revanche, cette étude apporte des éléments en faveur d'une diapédèse et d'une activité phagocytaire des neutrophiles plus intenses chez les animaux résistants. Globalement les animaux résistants CCS- répondraient à l'infection de manière plus précoce et plus intense, et pourraient en outre limiter l'emballement du processus inflammatoire et la survenue des effets délétères qui lui sont associés.

En conclusion, la sélection génétique sur le critère CCS, pratique aujourd'hui incontournable dans la sélection des animaux d'élevage, engendre au moins à court terme l'apparition d'animaux plus résistants aux mammites. Le support génétique expliquant une partie de la variabilité de la résistance à l'infection mammaire a été étudié par Rupp, dans une étude plus récente (Rupp et al., 2015), et l'identification d'un nouveau gène participant à la résistance aux mammites est détaillée ci-après.

(2) Identification d'un variant de *Socs2* prédisposant aux mammites

L'étude de Rupp (Rupp et al., 2015) a identifié un facteur génétique qui participe au contrôle de l'inflammation mammaire chez la brebis après infection mammaire. Le gène *Socs2* (Suppressor Of Cytokine Signaling 2) est un gène majeur pour le trait CCS chez la brebis Lacaune, dont le polymorphisme explique en grande partie la variabilité des phénotypes du trait CCS. Le séquençage du génome des brebis dans la région d'un QTL détecté sur le chromosome 3 a permis d'identifier une mutation du gène *Socs2*. Cette mutation ponctuelle p.R96C, a un effet majeur sur le caractère CCS.

b) La protéine SOCS-2

La famille SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) regroupe 8 protéines intracellulaires – SOCS 1 à 7 et CIS (cytokine-inducible SH2 domain-containing-protein) – impliquées dans la régulation des signaux cytokiniques, de facteurs de croissance et d'hormones (Piessevaux et al., 2008). Chacune d'elles est constituée d'un domaine Src homology 2 (SH2) – permettant la reconnaissance d'un résidu tyrosine phosphorylé – bordé par un domaine N-terminal variable d'une part et par un domaine C-terminal conservé nommé SOCS box d'autre part (Fig. 18) (Piessevaux et al., 2008).

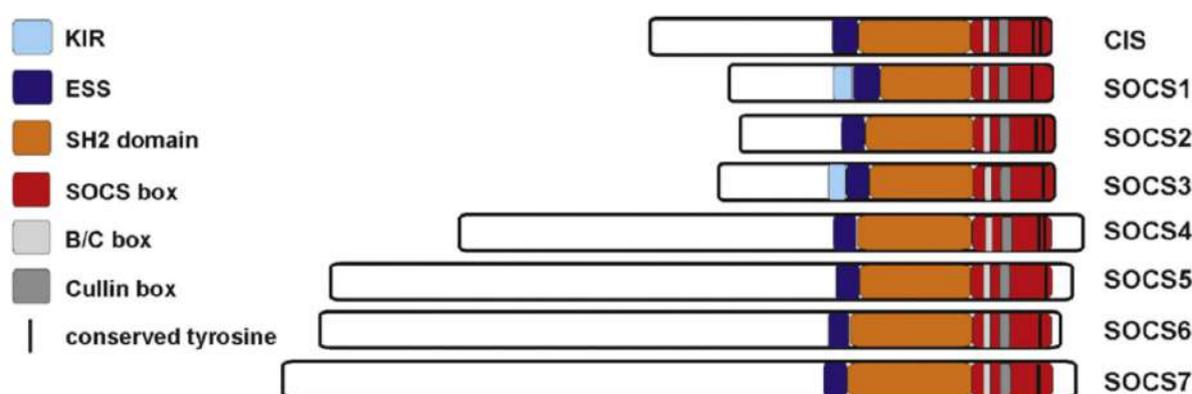


Fig. 18. Structure des protéines de la famille SOCS. (Piessevaux et al., 2008)

c) Rôle de SOCS-2 dans la réponse immunitaire innée

(1) Mise en évidence expérimentale

Dans l'étude de Rupp (Rupp et al., 2015) les brebis nées de béliers hétérozygotes C/T¹ et homozygotes T/T¹ respectivement présentent une augmentation significative de la concentration des cellules somatiques (CCS) du lait comparativement aux brebis nées de pères homozygotes C/C¹.

L'étude de Machado (Machado et al., 2006) révèle que des souris soumises à une infection intra-péritonéale par *Toxoplasma gondii* et chez lesquelles la protéine SOCS-2 est non fonctionnelle présentent une production de cytokines [chimiokines CCL2 (C-C motif

¹ C/C : individu ne présentant pas la mutation p.R96C

C/T : individu présentant la mutation p.R96C sur l'une des deux versions du gène *Socs2*

T/T : individu présentant la mutation p.R96C sur les deux versions du gène *Socs2*

chemokine ligand 2)] pro-inflammatoires incontrôlée » et une infiltration aberrante de leucocytes, monocytes et neutrophiles, sur le site de l'infection.

Des cellules dendritiques humaines dans lesquelles l'ARNm codant la protéine SOCS-2 est dégradé par interférence de l'ARN sécrètent une plus grande quantité de cytokines IL1- β et IL-10 lorsqu'elles sont stimulées par le LPS d'*E. coli* (Posselt et al., 2011). Cette tendance n'est pas observée pour les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 (Posselt et al., 2011).

(2) Mécanismes d'action mis en évidence

(a) La voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT

Plusieurs voies de signalisation peuvent être altérées parmi lesquelles la voie JAK/STAT. La liaison d'une cytokine à son récepteur est la première étape de transduction du signal et permet sa dimérisation. Les molécules JAK associées à la partie intracellulaire du récepteur sont activées par cette dimérisation. Sous leur forme activée, elles phosphorylent les résidus tyrosine des molécules STAT qui à leur tour se dimérisent. Les dimères de STAT peuvent ainsi exercer leur rôle de facteur de transcription après translocation nucléaire (Tizard, 2013).

(b) SOCS-2 limite l'activation du facteur de transcription STAT 3

L'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β et IL-10 par les cellules dendritiques déficientes en protéines SOCS-2 est la conséquence d'une augmentation transcriptionnelle de ces deux cytokines, entre 8 et 24 heures suivant la stimulation par le LPS, liée à la présence accrue du facteur de transcription STAT-3 activé (Posselt et al., 2011). La protéine SOCS-2 exerce donc un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-10 débutant quelques heures après la stimulation des cellules dendritiques par le LPS bactérien, en limitant l'activation du facteur de transcription STAT3 par un mécanisme qui reste à préciser.

(c) Compétition avec la molécule STAT pour les récepteurs cytokiniques

La liaison de SOCS-2 à un récepteur cytokinique met en jeu l'interaction entre le domaine SH2 de SOCS-2 et un résidu tyrosine phosphorylé présent sur la partie intracellulaire de certains récepteurs cytokiniques. Cette liaison empêche par un simple mécanisme de compétition la fixation de la protéine STAT sur le même résidu phosphorylé. Or, la liaison de

STAT à un récepteur de cytokines couplé au système JAK/STAT est une étape nécessaire à la transduction du signal cytokinique. Comme illustré sur la Fig. 19 (partie gauche de la figure) la fixation de STAT au récepteur cytokinique permet la formation d'un dimère de protéines STAT, lequel agit comme facteur de transcription de gènes cibles. SOCS-2 bloque ainsi la transduction du signal cytokinique faisant intervenir le système JAK/STAT (Fujimoto and Naka, 2003; Piessevaux et al., 2008; Rupp et al., 2015). La protéine SOCS-2 fonctionnelle participe au rétrocontrôle négatif de la synthèse de cytokines, notamment IL-6 (Table 2 de (Fujimoto and Naka, 2003))

(d) Dégradation protéasomale des protéines impliquées dans le système JAK/STAT

Dotée d'une boîte SOCS, la protéine SOCS-2 permet l'ubiquitinylation des protéines du système JAK/STAT avant dégradation par le protéasome, ayant ainsi un effet inhibiteur sur la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT (Piessevaux et al., 2008) (Fig. 19).

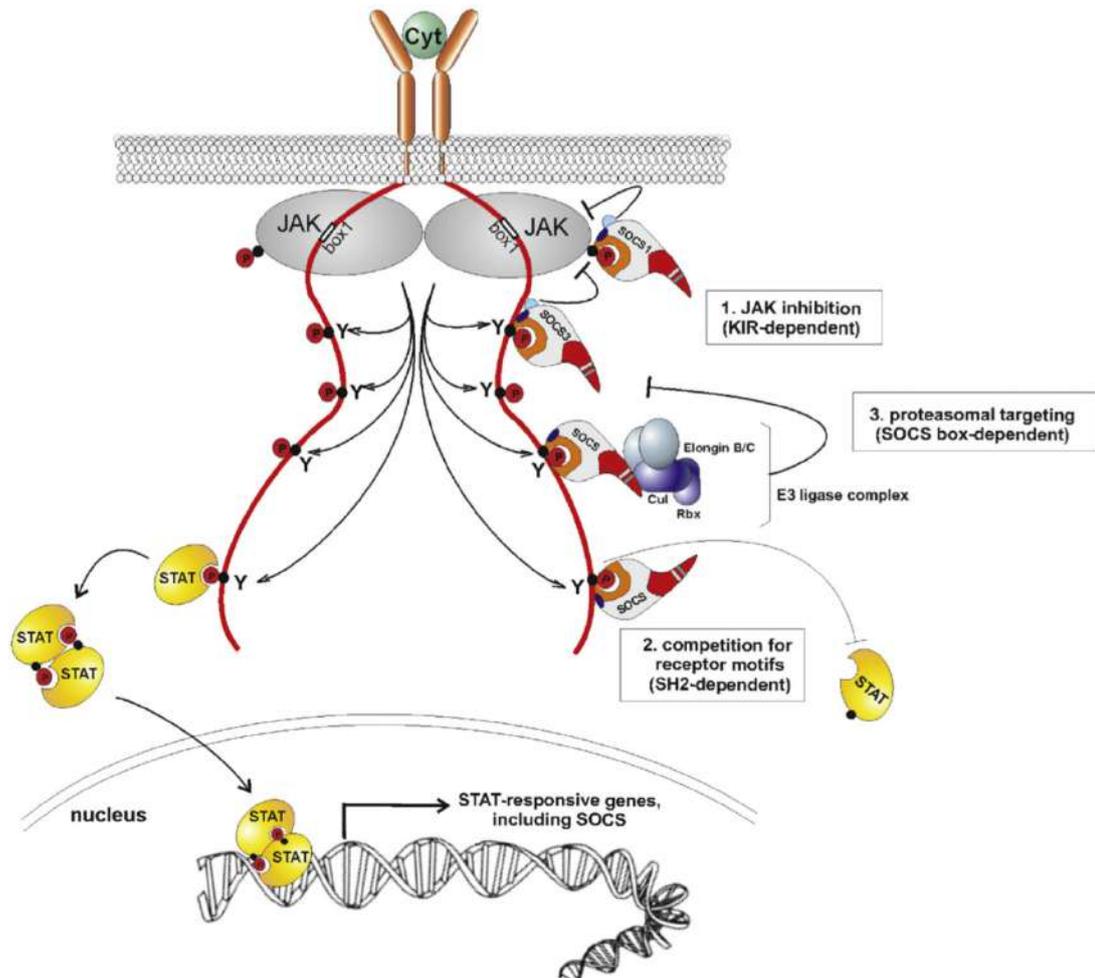


Fig. 19. Mécanismes d'action des protéines de la famille SOCS : 1, Les protéines SOCS 1 et 3 sont dotées d'un domaine KIR lequel inhibe l'activité de la kinase JAK ; 2, SOCS-2 agit par compétition avec STAT pour les récepteurs des cytokines couplés à la voie de transduction JAK/STAT ; 3, Dégradation par les protéasomes des substrats impliqués dans la voie de transduction JAK/STAT faisant intervenir la SOCS box. (Piessevaux et al., 2008).

Chapitre II

Etude expérimentale

I. Introduction

Deux groupes de brebis, désignées CCS+ et CCS-, ont été produits par sélection divergente, au domaine expérimental INRA de La Fage (UE 321, Roquefort, France). Pour cela des brebis de phénotypes CCS connus, ont été inséminées avec des béliers dont les index CCS étaient extrêmes (favorables, c'est-à-dire fortement positifs ou défavorables, donc négatifs par rapport à la population de référence). La caractérisation initiale des animaux issus de cette sélection, à travers les résultats de nombreuses études (Rupp et al., 2009; Toufeer et al., 2011; Bonnefont et al., 2011, 2012), suggère que la réponse immunitaire à l'infection intramammaire diffère entre les deux lignées divergentes. Cette étude (Rupp et al., 2009) a été la première à mettre en évidence, une meilleure résistance des brebis CCS-, qui présentent, en comparaison avec les brebis CCS+, moins de mammites cliniques, moins d'abcès parenchymaux mammaires et une meilleure capacité à éliminer les infections durant la lactation. L'exploration des facteurs génétiques, par analyse du transcriptome notamment, pouvant expliquer une partie de la variabilité de la réponse immunitaire observée a déjà dévoilé l'implication probable de quelques gènes d'intérêt immunitaire, parmi lesquels *il1b*, *il8*, *ido1*, *ilrap* et *myd88* (Bonnefont et al., 2011, 2012). Plus récemment, au cours d'une analyse génétique d'association menée par Rupp (Rupp et al., 2015) un QTL pour le trait CCS a été identifié sur le chromosome OAR3 de la brebis Lacaune. Le séquençage plus fin du QTL a conduit à la découverte d'une mutation non synonyme dans le gène *Socs2*. Cette mutation, nommée p.R96C, est à l'origine d'une modification de la séquence d'acides aminés (sur le résidu 96, l'arginine est remplacée par une cystéine) de la protéine SOCS-2. Les conséquences fonctionnelles de cette mutation ont été analysées et ont permis de montrer que la mutation a pour conséquence une inactivation fonctionnelle de la protéine par perte de l'affinité de liaison à ses ligands dans la région SH2. Cette mutation, localisée dans le domaine SH2 qui constitue un site de liaison à de nombreux ligands, rend notamment impossible la liaison de SOCS-2 aux résidus phosphorylés du récepteur de l'hormone de croissance (Rupp et al., 2015). La protéine SOCS-2 est impliquée dans la régulation de nombreux signaux cellulaires et en particulier ceux mettant en jeu les cytokines inflammatoires.

A la lumière des résultats de toutes ces études, on peut poser comme hypothèse que la réponse inflammatoire à l'infection intra-utérine diffère entre les deux lignées CCS et qu'elle est meilleure chez les brebis CCS-. Les gènes de résistance aux infections utérines étant pour l'heure inconnus et afin de tester l'hypothèse selon laquelle le gène *Socs2* participe à la

variabilité de la réponse immunitaire lors d'infection utérine, en particulier de l'endomètre dans notre étude, il nous a paru nécessaire de connaître au préalable le génotype de chacun des animaux des deux lignées pour connaître la forme du gène *Socs2* portée par les brebis.

Plus concrètement, l'objectif de cette étude est d'étudier la réponse clinique, lésionnelle et physiopathologique à une endométrite expérimentale, de brebis dont la prédisposition génétique aux mammites est significativement différente après sélection génétique, en comparant des brebis CCS+ porteuses de la mutation p.R96C (la mutation est plus fréquente dans cette catégorie d'animaux) et des brebis CCS- porteuses de la forme sauvage du gène *Socs2*,

Pour cela, des brebis issues des deux lignées divergentes et préalablement génotypées ont été inoculées par voie laparoscopique avec l'agent *Escherichia coli*, injecté dans la lumière de la jonction utéro-tubaire. Afin d'évaluer la réponse dans un contexte proche de celui du postpartum immédiat, dans la mesure où les études sont nombreuses à démontrer une influence du statut hormonal et métabolique sur la réponse immunitaire, une restriction énergétique, afin provoquer une cétose subclinique, ainsi que l'administration d'un progestagène pendant quelques jours avant l'inoculation et de PGF2 α deux jours avant l'inoculation (pour lyser le corps jaune) ont été effectuées. Au regard des données accumulées sur la biologie des cellules impliquées dans la réponse aux infections intra-utérines, endométriales en particulier (Cronin et al., 2012), la réponse a été évaluée 24 heures après l'inoculation. L'analyse lésionnelle et physiopathologique a consisté à observer les modifications macroscopiques de l'utérus et des ovaires – à savoir le poids de l'organe, le volume de liquide intra-utérin collecté, la présence de corps jaunes et leur statut – puis à mesurer le titre bactériologique et la concentration des différentes populations de cellules présentes dans le lavage de la lumière des deux cornes. La présence éventuelle d'une réponse systémique à l'infection expérimentale a été recherchée à partir d'un suivi clinique succinct et de l'analyse des paramètres sanguins, en particulier des leucocytes et des différentes sous-populations.

Dans notre étude, certains résultats significatifs, concernant notamment la capacité précoce à limiter l'infection, apportent des informations nouvelles sur la variabilité de la réponse immunitaire lors d'infection intra-utérine entre les brebis des lignées issues de la sélection divergente sur le critère CCS.

II. Matériels et méthodes

A. Approbation éthique

L'étude a été autorisée par le Ministère de la Recherche sous le numéro APAFIS APAFIS#5026-201604181223851. Le projet précité a été évalué par le Comité d'éthique en expérimentation animale N° 115 et a reçu un avis favorable. Les essais ont été réalisés conformément à la directive européenne 2010/63/UE et en réduisant autant que possible la souffrance des animaux au cours de l'essai.

B. Animaux

L'étude a été conduite sur 24 brebis de race Lacaune, multipares, non gravides. Les brebis sont issues des lignées de la sélection divergente sur le critère CCS de l'Unité Expérimentale INRA La Fage. En outre les allèles du gène *Socs2* ont été préalablement déterminés par génotypage (Rupp, 2015). Les brebis étaient indemnes des maladies réglementées en France et indemnes d'infection par le virus border (BDV).

Les groupes expérimentaux « CCS+ inoc », « CCS- inoc » et « contrôle » comptaient respectivement dix brebis de la lignée CCS+ et de génotype (C/T), dix brebis de la lignée CCS- et de génotype (C/C), quatre brebis de la lignée CCS- et de génotype (C/C). Le génotype (C/T) indique la présence de la mutation p.R96C sur un des deux allèles du gène *Socs2*, laquelle mutation est absente chez les brebis de génotype (C/C). La connaissance de la séquence du gène *Socs2* est un critère d'inclusion. Ce choix a été réalisé en raison de la forte association entre la lignée CCS+ et le génotype *Socs2* muté.

C. Conditions d'hébergement et alimentation

Les brebis ont été hébergées dans des parcs en bergerie depuis leur réception jusqu'au jour de l'inoculation, alimentées avec du foin distribué à volonté de manière biquotidienne. Le paillage des parcs était réalisé quotidiennement. Aucun curetage n'a été réalisé compte tenu de la faible durée de l'essai expérimental.

D. Synchronisation des cycles sexuels et phase progestéronique

Mise en place des implants de norgestomet

Afin de recréer un contexte proche de celui de la fin de gestation puis du début de la lactation et le statut ovarien de chaque brebis (présence ou non de corps jaunes) ne pouvant pas être connu a priori, l'administration par implant sous-cutané d'un progestagène, le norgestomet, pendant les 6 jours précédant l'inoculation, puis l'induction de la lutéolyse du ou des corps jaune(s) éventuellement présent(s) deux jours avant l'inoculation par administration d'un analogue de PGF 2α ont été effectuées.

Ainsi, plus précisément un implant de norgestomet (CRESTAR ® PACK, 3,30 mg de norgestomet dans un implant de 275 mg) a été mis en place dans l'encolure gauche en position sous-cutanée chez toutes les brebis des trois groupes expérimentaux six jours avant l'inoculation, sans administration de busérelina. L'implant de norgestomet est maintenu en place pendant tout l'essai et jusqu'à l'euthanasie des brebis ; sa présence a été vérifiée au moment de l'examen nécropsique réalisé pour le prélèvement de l'utérus.

Induction de la lutéolyse par injection de prostaglandines F2 alpha (PGF 2α)

Afin de produire la lyse d'éventuels corps jaunes présents deux jours avant l'inoculation, une injection de PGF 2α a été réalisée chez toutes les brebis. Les brebis ont été traitées avec ENZAPROST ® (dinoprost 5 mg/mL) 48 heures avant l'inoculation à la posologie suivante : 7 mg/brebis soit 1,4 mL par voie intramusculaire.

E. Conditions d'hébergement préopératoires

Les brebis ont été transférées 24 h avant l'inoculation dans des box dont la litière était composée de sciure afin de permettre une diète hydrique complète. Une diète hydrique préopératoire a été pratiquée de 24 h à 12 h avant l'inoculation. Enfin, l'accès à l'eau a été retiré 12 h avant l'inoculation. Outre la mise en place de l'implant de norgestomet, la restriction énergétique menée avant l'inoculation d'*E. coli* a été motivée par la volonté de provoquer chez les brebis une cétose subclinique, affection métabolique caractéristique du postpartum. Par ailleurs le jeune permettait de réduire le volume ruminal au moment de l'intervention chirurgicale.

F. Préparation et conservation de l'inoculum

La souche MS499 d'*Escherichia coli* aimablement fournie par le professeur I. Sheldon a été utilisée pour l'inoculation. Après titration, le titre de l'inoculum a été déterminé afin d'administrer une quantité d'environ 10^3 UFC/brebis.

La mesure de la concentration de l'inoculum a été réalisée a posteriori afin de vérifier que la dose recherchée avait effectivement été administrée.

G. Inoculation intra-utérine par voie coelioscopique

Un volume de 5 mL d'inoculum (dosé à 100 UFC/mL) a été injecté dans la lumière de chacune des deux cornes utérines, soit 10 mL au total par brebis. L'extrémité du capillaire utilisé pour l'inoculation a été insérée dans la lumière de la jonction utéro-tubaire préalablement ponctionnée par un trocart ayant le diamètre du capillaire. L'extériorisation de la jonction utéro-tubaire hors de la cavité abdominale, afin de faciliter l'inoculation, a été guidée par coelioscopie. L'opération a été menée sous anesthésie générale selon le protocole anesthésique suivant : induction avec diazépam 0,11 mg/kg IV (Valium®) et kétamine 4,4 mg/kg IV (Anaestamine®) puis maintien de l'anesthésie avec de l'isoflurane. Les heures d'induction de l'anesthésie et d'inoculation ont été enregistrées.

Le groupe témoin a reçu une injection intra-utérine de NaCl dans les mêmes conditions de réalisation que les brebis inoculées.

H. Suivi clinique

La fiche de suivi clinique utilisée pendant l'essai expérimental est présentée en Annexe 3. **Fiche de suivi clinique.** Le suivi clinique a consisté en la réalisation d'examens cliniques avant l'induction de l'anesthésie (temps noté t_0) et 24h après l'inoculation avant euthanasie (temps noté t_{24h}).

Les fréquences cardiaque et respiratoire ont été relevées au cours de ces examens cliniques. La température du rumen a été enregistrée en continu à l'aide d'un capteur de température San'Phone intégré dans un bolus ruminal ThermoBolus®, commercialisé par la société MEDRIA.

I. Données paracliniques

1. Prises de sang

Quatre échantillons de sang veineux ont été collectés sur chaque brebis à t_0 et à t_{24h} dans les tubes à prélèvement de sang sous vide suivants : un tube sec, un tube EDTA de contenance 10 mL, un tube EDTA de contenance 5 mL et un tube hépariné. Les prises de sang ont été réalisées à la veine jugulaire. Les tubes EDTA de 10 mL et tubes héparine ont été conservés dans un bac de glace, les tubes EDTA de 5 mL et tubes secs l'étant à température ambiante.

2. Hémogramme

Un hémogramme a été réalisé pour chaque brebis à t_0 et t_{24h} . Les paramètres suivants de l'hémogramme ont été retenus pour interprétation : la concentration des plaquettes exprimée en $10^3/\mu\text{L}$ et les concentrations en leucocytes, neutrophiles, lymphocytes et monocytes exprimées en $10^9/\text{L}$.

J. Prélèvement et pesée de l'utérus

Chacune des brebis a été euthanasiée 24h suivant l'inoculation, par l'administration de 10 mL de T61 ® (embutramide 200 mg/mL, mébézonium sous forme de diiodure 26,92 mg/mL) suivie d'une exsanguination par section des artères carotides. Pour chaque brebis, l'ensemble utérus et ovaires a été extrait, puis pesé de manière standardisée. L'observation des ovaires a permis de préciser la présence ou l'absence de follicules et de corps jaunes.

K. Analyse bactériologique et cytologique du contenu utérin

Le contenu utérin a fait l'objet d'une analyse bactériologique et d'une numération des différentes populations de leucocytes présents.

Un volume de 100 μL de contenu utérin est ajouté à 900 μL de tampon PBS (Phosphate-buffered saline) pour former la solution P dite « pure ». Six dilutions au dixième à l'aide de PBS ont permis de former les solutions diluées de 10^{-1} à 10^{-6} à partir de la solution P. La culture bactériologique sur boîte de Pétri à 37°C pendant 24 heures de 100 μL de chacune des sept solutions préparées (P à 10^{-6}) a permis le dénombrement des colonies bactériennes.

Le dénombrement des leucocytes, neutrophiles, lymphocytes et monocytes présents dans le contenu utérin a été réalisé par cytométrie de flux avec marquage spécifique de chaque sous-population.

L. Analyse statistique

Les données sont représentées graphiquement par la moyenne et l'écart-type (SD, standard deviation). La réalisation des graphiques et la comparaison des groupes, par ANOVA (analyse de variance) et tests de comparaisons multiples de Tukey ou de Sidak, et test de Student, ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism version 7.0b pour Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com), la valeur de 0.05 étant retenue comme seuil de significativité.

III. Résultats

A. Fréquences cardiaque, respiratoire et température ruminale

Les fréquences cardiaque, respiratoire et ruminales ont été enregistrées avant l'inoculation puis 24h après (cf. Fig. 20). Aucune différence majeure entre les groupes n'a été observée.

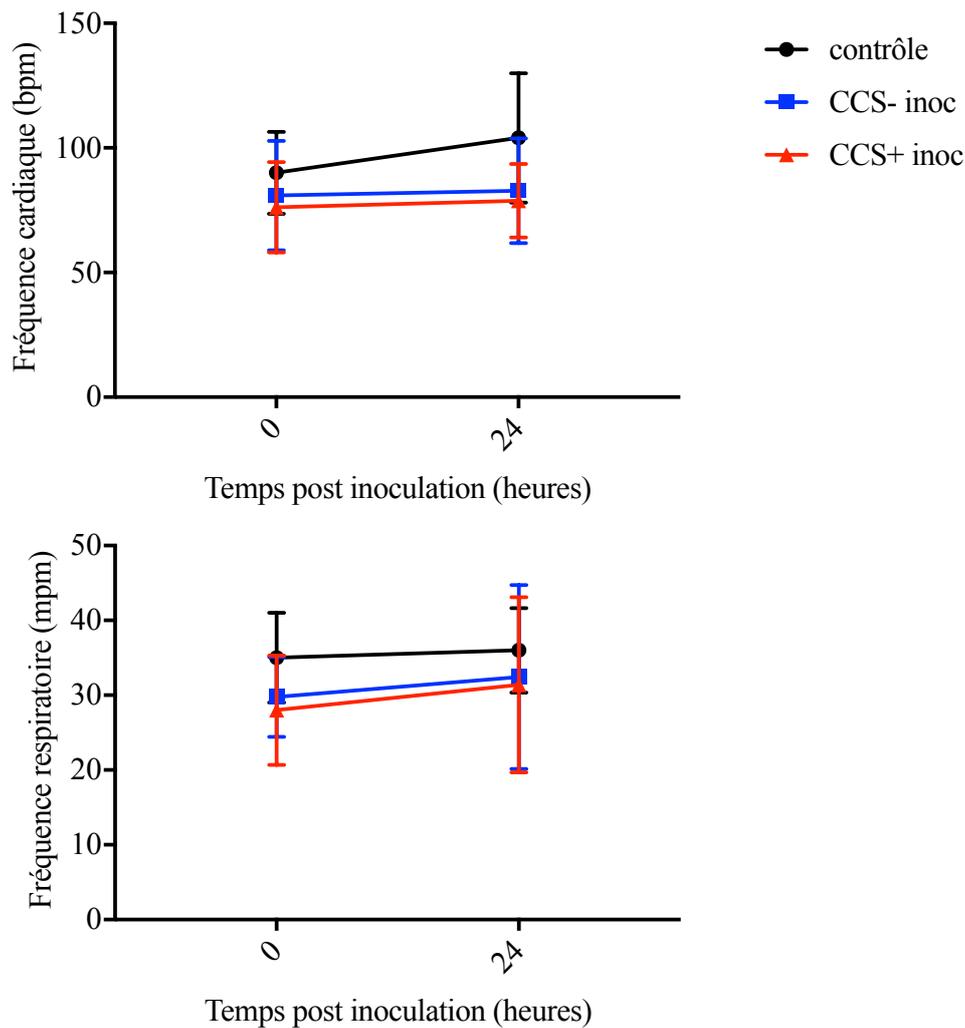


Fig. 20. Fréquences cardiaque et respiratoire chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé. Pour chaque groupe expérimental, les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Le test de comparaisons multiples de Sidak a été utilisé. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement pour un groupe expérimental donné, entre t0 et t24 (p -value < 0,05). Des lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs (p <0,05) respectivement entre les groupes contrôle et CCS-, les groupes contrôle et CCS+ et les groupes CCS- et CCS+. (cf. Annexe 4)

L'ANOVA à deux facteurs révèle l'absence d'interaction entre le facteur groupe et le facteur temps, l'absence d'effet groupe, en d'autres termes les moyennes des températures ne diffèrent pas entre les trois groupes avant l'inoculation et 24 h après l'inoculation, et enfin l'absence d'effet temps, soit l'inoculation n'a pas provoqué de changement significatif concernant ces deux paramètres cliniques entre t0 et t24, quel que soit le groupe considéré.

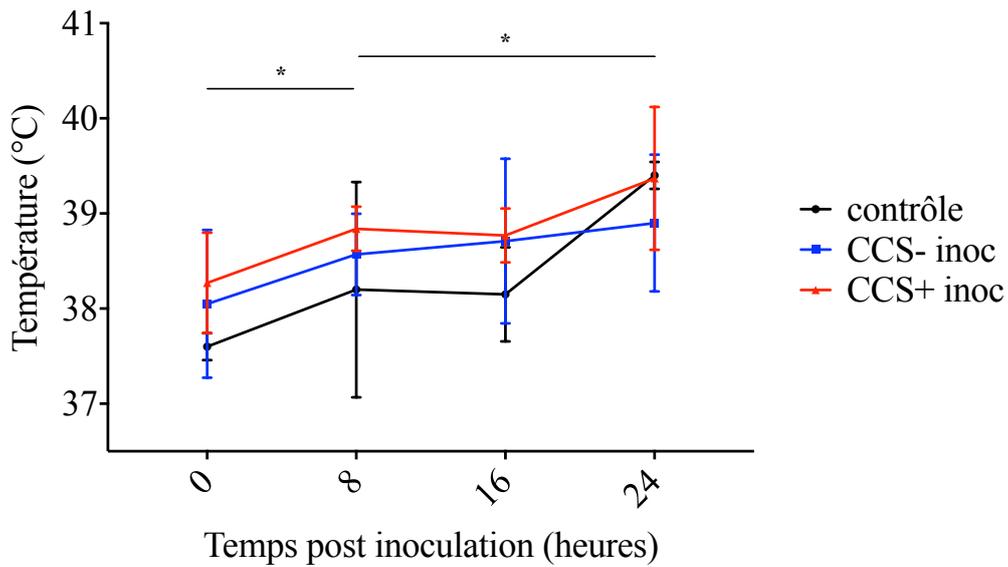


Fig. 21. Températures chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé. Pour chaque groupe expérimental, les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Le test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé. Le symbole * est apposé la température moyenne tous groupes compris est significativement différente entre deux temps post-inoculation (p -value < 0,05). Des lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs (p <0,05) respectivement entre les groupes contrôle et CCS-, les groupes contrôle et CCS+ et les groupes CCS- et CCS+.

Concernant l'étude de la température ruminale (cf. Fig. 21), l'ANOVA révèle l'absence d'interaction entre le facteur groupe et le facteur temps. Il n'existe pas non plus d'effet groupe, en d'autres termes les moyennes des températures ne diffèrent pas entre les trois groupes avant l'inoculation et après l'inoculation, quel que soit le temps (8, 16 ou 24h). En revanche il existe un effet temps : la température moyenne tous groupes compris est significativement plus élevée à 8h post-inoculation comparée au temps t0. Une différence significative existe entre t8 et t24.

B. Caractéristiques macroscopiques de l'utérus et des ovaires

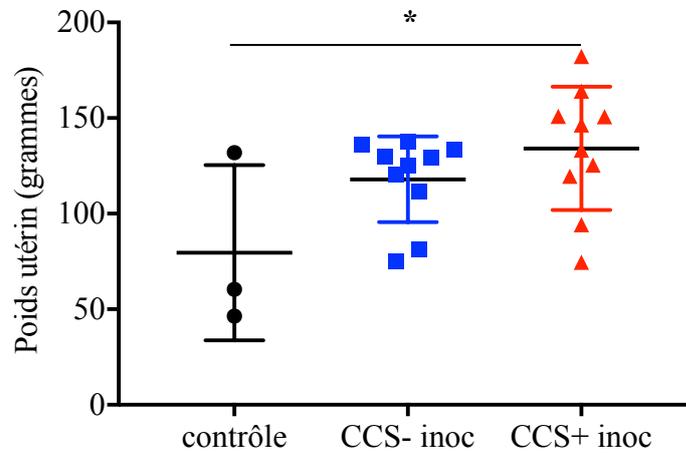


Fig. 22. Poids utérin moyen des groupes contrôle, CCS- et CCS+. Les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. Le test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé pour comparer le poids utérin des brebis CCS- inoculées et CCS+ inoculées. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement entre deux groupes (p -value < 0,05) (cf. Annexe 5).

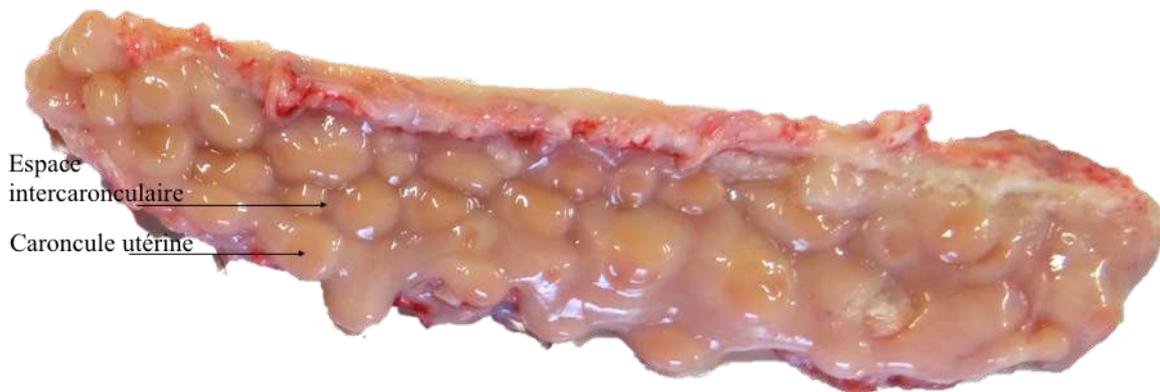


Fig. 23. Aspect macroscopique de l'endomètre utérin d'une brebis après section longitudinale de l'utérus, 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*Escherichia coli*.

Les résultats concernant l'aspect macroscopique de l'utérus sont les suivants.

L'utérus des brebis du groupe CCS+ inoculé pèse en moyenne 54,53 grammes de plus que celui des brebis du groupe contrôle (ANOVA à un facteur et test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$; cf. Fig. 22 ci-contre). Aucune différence significative du poids utérin entre les groupes CCS+ inoculés et CCS- inoculés n'est observée.

L'aspect macroscopique de l'endomètre utérin 24 heures après l'inoculation apparaît sur la Fig. 23. On y aperçoit de nombreuses caroncules utérines. Les observations faites durant l'autopsie et le prélèvement des utérus sont notamment (cf. Annexe 6) : hémorragie interne, utérus chaud, nécrose de l'oviducte. Aussi, un certain nombre de brebis présentent, lors de l'inspection des ovaires, des corps jaunes qui semblent, pour la plupart, inactifs (lutéolyse et lésion cicatricielle).

C. Données d'hémogramme

Les numérations leucocytaires totale et différentielle du sang ont été mesurées à deux temps : avant et après l'inoculation. Des variations du nombre de leucocytes totaux et des neutrophiles sont observées (cf. Fig. 24).

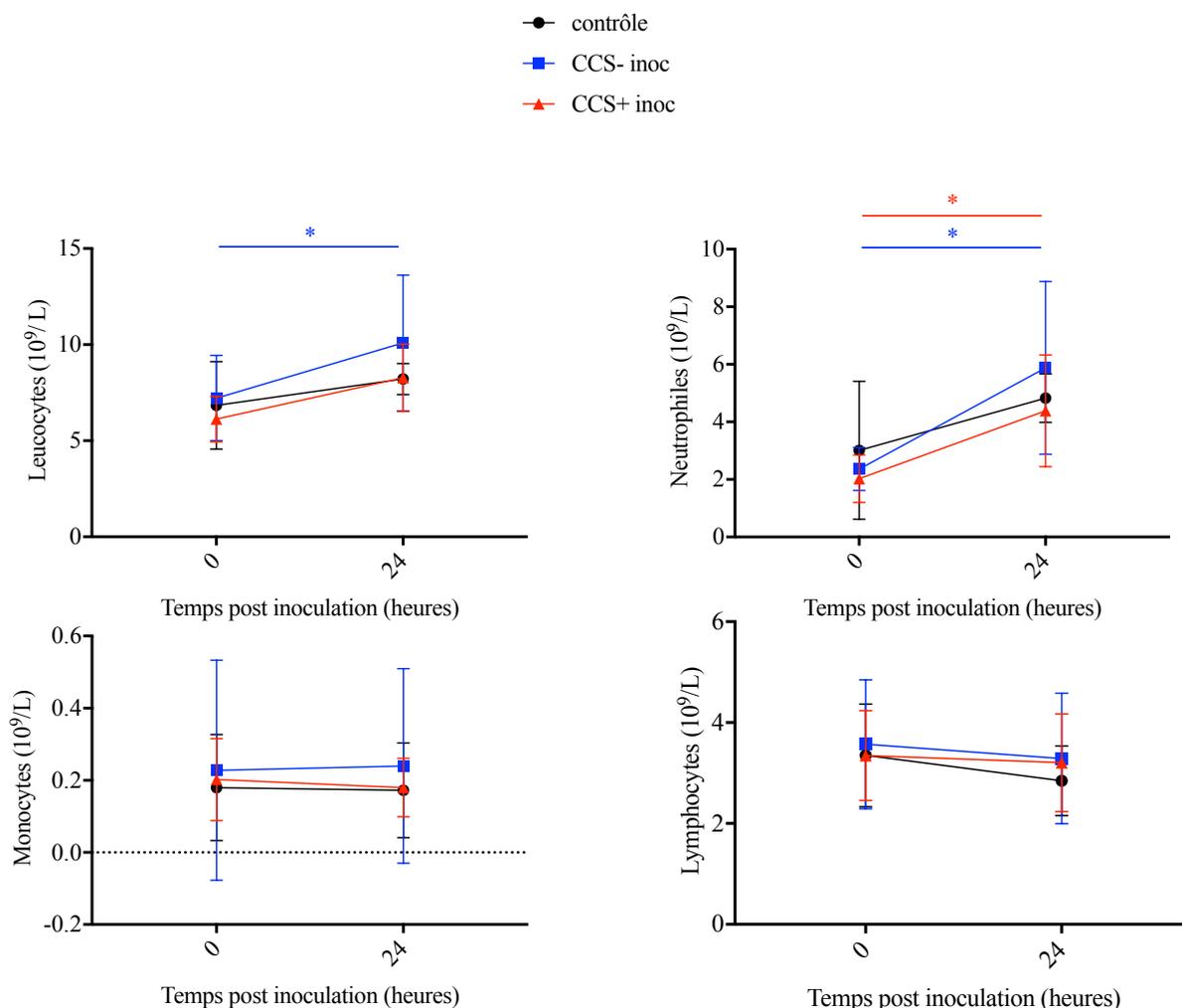


Fig. 24. Concentrations sanguines de leucocytes, neutrophiles, monocytes et lymphocytes chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé, à t0 puis t24, exprimées en $10^9/L$. Pour chaque groupe expérimental, les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Le test de comparaisons multiples de Sidak a été utilisé. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement entre t0 et t24 pour un groupe expérimental donné (p -value $< 0,05$). Des lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs ($p < 0,05$) respectivement entre les groupes contrôle et CCS-, les groupes contrôle et CCS+ et les groupes CCS- et CCS+. (cf. Annexe 7)

L'ANOVA à deux facteurs ne révèle aucune interaction entre le facteur temps et le facteur groupe.

La réponse systémique à l'infection intra-utérine par *E. coli* est caractérisée par une augmentation significative de la concentration sanguine de leucocytes et neutrophiles au cours des 24 heures suivant l'inoculation avec *E. coli*, chez les groupes CCS- et CCS+ (ANOVA à deux facteurs, p-value < 0.05). Aucun changement significatif n'est advenu entre t0 et t24 dans le groupe contrôle. Concernant les concentrations sanguines de monocytes et lymphocytes, aucune évolution significative n'est observée entre t0 et t24, quel que soit le groupe expérimental considéré (cf. Fig. 24).

Enfin, les concentrations sanguines des leucocytes totaux et des différentes sous-populations sanguines (neutrophiles, lymphocytes et monocytes) ne diffèrent pas significativement entre les trois groupes avant l'inoculation. Il en est de même vingt-quatre heures après l'inoculation.

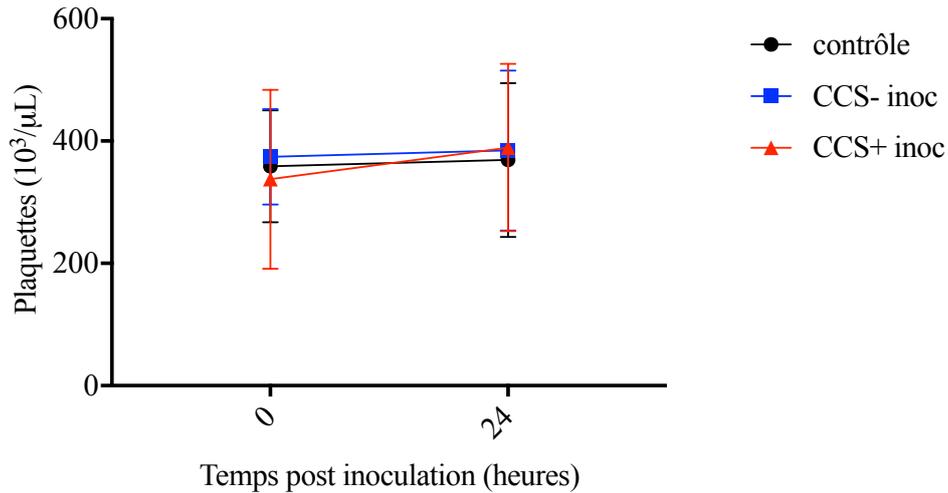


Fig. 25. Concentration sanguine de plaquettes chez les brebis du groupe contrôle, du groupe CCS- inoculé et du groupe CCS+ inoculé à t0 puis t24 exprimée en 10³/μL. Les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs. Le test de comparaisons multiples de Sidak a été utilisé. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement entre t0 et t24, pour un groupe expérimental donné (p-value < 0,05). Des lettres (a, b, c) indiquent les résultats significatifs (p<0,05) respectivement entre les groupes contrôle et CCS-, les groupes contrôle et CCS+ et les groupes CCS- et CCS+. (cf. Annexe 8)

L'ANOVA ne révèle aucune interaction entre le facteur temps et le facteur groupe.

Il n'existe aucune évolution significative de la concentration de plaquettes entre t0 et t24, quel que soit le groupe et il n'existe aucune différence significative entre les groupes expérimentaux, à t0 et à t24 (cf. Fig. 25).

D. Analyse bactériologique du contenu utérin

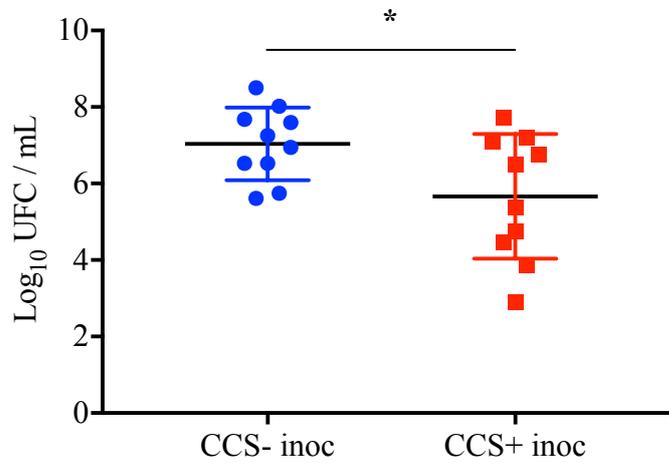


Fig. 26. Concentration bactérienne moyenne du contenu utérin des animaux des groupes CCS- inoculés et CCS+ inoculés en Log₁₀ UFC / mL. Les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD pour standard deviation), et analysées à l'aide d'un test de Student non-apparié. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement entre deux groupes (p -value < 0,05). (cf. Annexe 9)

Le dénombrement de *E. coli* par la technique culturale à partir du liquide utérin, collecté après vingt-quatre heures a permis de montrer l'absence de croissance bactérienne dans le groupe contrôle. A l'inverse pour les groupes CCS- inoculé et CCS+ inoculés des concentrations variables de la bactérie *E. coli* ont été mesurées pour le groupe contrôle (cf. Fig. 26 ci-contre).

La comparaison des valeurs entre les deux groupes inoculés montre que la concentration bactérienne est significativement plus faible dans la lumière utérine des brebis CCS+ comparée à celle des brebis CCS-. La différence est de $1,376 \pm 0,5962 \text{ Log}_{10} \text{ UFC / mL}$ (cf. Annexe 9) (two-sample t (df=18) = 2,3, one-tailed p-value = 0,0165).

E. Analyse cytologique du contenu utérin

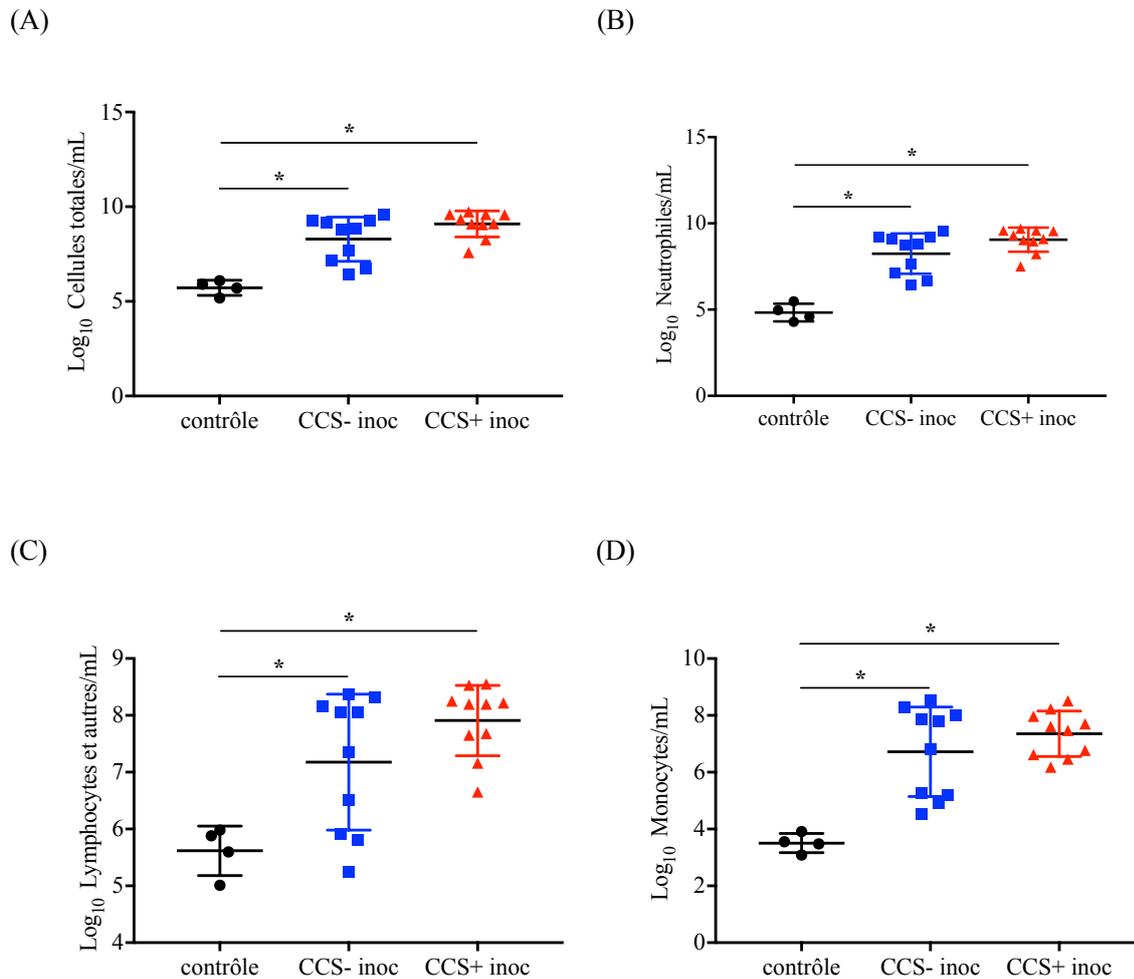


Fig. 27. Concentration des différents types de leucocytes dans le lavage utérin 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*E. coli*, avec cellules totales (A), neutrophiles (B), lymphocytes et autres (C), monocytes (D), exprimée en Log₁₀ / mL. Les données sont représentées par la moyenne et l'écart-type (SD), et analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. Le test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé pour comparer les concentrations des différentes populations de cellules du lavage utérin entre les groupes. Le symbole * est apposé lorsque la moyenne diffère significativement entre deux groupes (p -value < 0,05). (cf. Annexe 10)

L'analyse cytologique du contenu utérin comme indicateur de la réponse locale a donné les résultats suivants.

Quelle que soit la population de leucocytes prise en compte, le nombre de cellules recueillis lors du lavage utérin des groupes inoculés et groupe témoin diffère (ANOVA à un facteur et test de comparaisons multiples de Tukey, p-values < 0.05 ; Fig. 27) : la lumière utérine des brebis inoculées avec *E. coli* contient significativement plus de leucocytes totaux, de granulocytes neutrophiles, de lymphocytes et de monocytes que celle des brebis injectées avec la solution de NaCl 0,9%. Ainsi, l'inoculation d'*E. coli* est à l'origine d'une réponse locale, caractérisée par un recrutement massif de cellules, en particulier de neutrophiles et de monocytes, sur le site de l'infection.

La lumière utérine des brebis CCS+ inoculées contient en moyenne plus de leucocytes, neutrophiles, lymphocytes et monocytes que celle des brebis CCS- inoculées, mais cette différence n'est pas significative (ANOVA à un facteur et test de comparaisons multiples de Tukey, p-values respectivement de 0.14, 0.14, 0.19 et 0.46 ; cf. Fig. 27).

IV. Discussion

L'objectif de l'étude qui était de comparer la réponse endométriale entre des brebis dont la prédisposition aux mammites d'origine génétique est significativement différente a été atteint. Nous avons observé des différences dont il convient d'examiner la signification et la portée, avant d'envisager des études complémentaires.

A. Analyse critique du modèle expérimental utilisé

1. Critères d'inclusion et d'exclusion

L'âge des brebis utilisées était variable, les plus jeunes ayant approximativement 1 an et les plus âgées 6 ans au moment de l'essai. A notre connaissance, l'effet de l'âge en soi sur le risque d'endométrite chez la vache ou la brebis n'a pas été déterminé. Cependant, de nombreuses études ont montré que le vieillissement constitue l'une des causes de dysfonctionnement du système immunitaire inné chez l'homme, la souris (Shaw et al., 2013). Chez la vache, il a été montré que la sévérité des mammites par exemple s'accroît avec l'âge faisant suspecter de moins bonnes capacités de réponse immunitaire chez les vaches les plus âgées. Pour ne citer que quelques exemples, la chimiotaxie des neutrophiles est réduite chez la souris âgée, de même que la production de cytokines par les macrophages ou encore l'expression des récepteurs TLR. Des différences d'âge entre animaux peuvent donc créer une plus grande variabilité expérimentale à l'origine d'une diminution de la puissance statistique, comme nous le verrons plus loin. Cependant, nous avons pris la précaution d'apparier les deux groupes inoculés en fonction de l'âge, si bien que l'âge moyen et la distribution étaient identiques entre les deux groupes.

2. Comparaison des animaux des deux lignées avant l'inoculation

Pour toutes les variables pour lesquelles cela était possible, des mesures ont été effectuées avant l'inoculation pour exclure un biais pré-inoculation. La comparaison des données à l'aide d'une ANOVA a permis de s'assurer de l'absence de différences préalables à l'infection utérine expérimentale entre les deux groupes. Cependant cette démarche n'a pas pu être réalisée pour toutes les variables qui ne peuvent être acquises qu'après l'euthanasie, telles que le poids utérin, la présence d'une inflammation utérine latente ou celle de bactéries présentes dans la lumière ou l'endomètre. Il était difficile d'analyser l'état inflammatoire de l'endomètre avant inoculation, et la présence éventuelle d'une infection à cause de

l'impossibilité à franchir un col pour la réalisation d'un prélèvement. Cependant l'intervalle de temps depuis la dernière mise-bas étant long et bien supérieur à 6 mois ; la probabilité d'une infection pré-existante l'infection est faible. Par ailleurs, aucun germe autre que celui inoculé n'a été détecté lors de la culture bactériologique du liquide recueilli après lavage utérin dans le groupe témoin.

3. Comparaison et analyse statistique de groupes à faible effectif

L'interprétation des résultats obtenus après l'analyse statistique à l'aide d'une ANOVA nécessite la vérification des trois hypothèses suivantes, listées par ordre décroissant d'importance : l'hypothèse fondamentale d'homoscédasticité (variance des erreurs constante), l'indépendance des valeurs et enfin l'hypothèse de normalité des erreurs (95% des résidus appartiennent à l'intervalle $[-1,96, 1,96]$). Ainsi pour chaque variable du modèle, les hypothèses d'homoscédasticité et de normalité sont vérifiées par l'observation du graphe des résidus. La transformation des données par la fonction logarithme a permis pour certaines variables d'obtenir une distribution homogène des résidus et donc de valider l'hypothèse d'homoscédasticité (cf. Fig. 28). Les données sont considérées indépendantes.

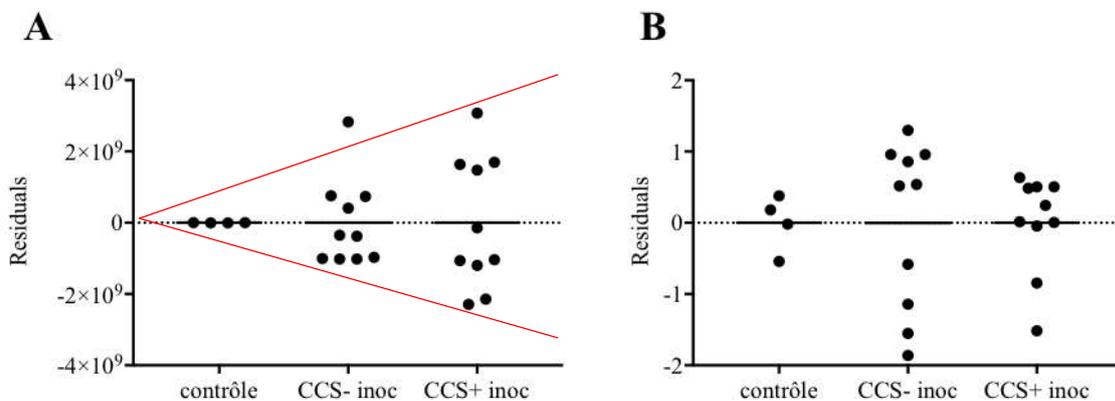


Fig. 28. *Graphes des résidus de la variable 'Concentration en cellules totales dans le lavage utérin' (A) et graphes des résidus de la même variable transformée par la fonction logarithme (B).*

La variable 'Concentration de monocytes dans le contenu utérin' est la seule variable étudiée pour laquelle la transformation des données par le logarithme n'a pas permis de valider l'hypothèse d'homoscédasticité (cf. Fig. 29).

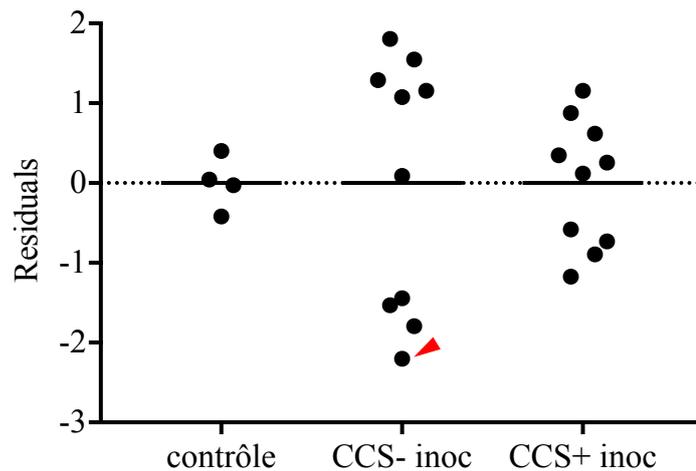


Fig. 29. Graphe des résidus pour la variable ‘Concentration de monocytes dans le contenu utérin’ transformée par la fonction logarithme. La distribution des résidus n’est pas homogène. En revanche l’hypothèse de normalité est vérifiée : au moins 95% des valeurs appartiennent à l’intervalle $[-2 ; 2]$, une seule valeur n’appartenant pas à cet intervalle (pointée par la flèche rouge).

La figure suivante (cf. Fig. 30) montre l’aspect du graphe des résidus lorsque l’hypothèse d’homoscédasticité est vérifiée : la distribution des résidus est homogène d’un groupe à l’autre.

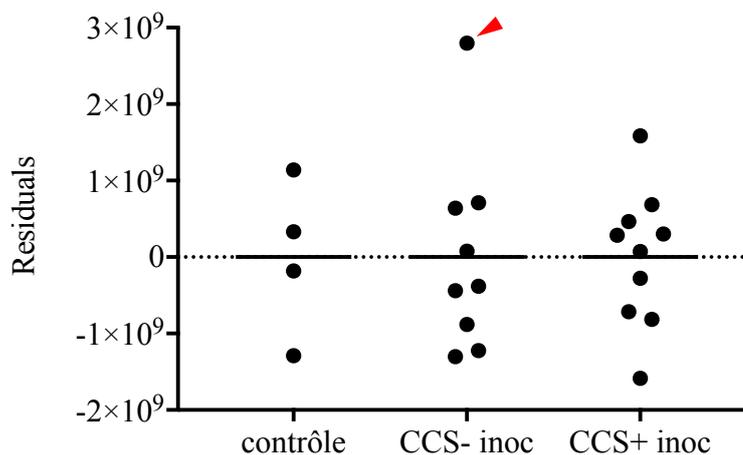


Fig. 30. Graphe des résidus pour la variable ‘Concentration sanguine de lymphocytes à t0’ non transformée. La distribution des résidus est homogène d’un groupe à l’autre. De plus l’hypothèse de normalité des erreurs est vérifiée : une seule valeur (pointée par la flèche rouge) n’appartient pas à l’intervalle $[-2.10^9 ; 2.10^9]$ et 95% des valeurs appartiennent à cet intervalle.

Les moyennes des poids utérins et de la concentration de cellules dans le lavage utérin – quel que soit le type cellulaire – des groupes CCS+ (n=10) et CCS- (n=10), comparées par analyse de la variance et un test post-hoc de Tukey, ne diffèrent pas significativement (valeur de p ajustée = 0,14). L'hypothèse nulle H_0 , qui consiste en l'égalité des moyennes des deux groupes CCS+ et CCS-, est acceptée avec un risque β (= risque de l'accepter à tort). Ce risque β est élevé lorsque la différence entre les moyennes et/ou la taille des effectifs est/sont faibles et/ou la variance est élevée. On accepte H_0 possiblement par manque de puissance – la puissance exprimant la probabilité de détecter une différence lorsqu'elle existe réellement – ce manque de puissance étant dû possiblement à la faible taille des effectifs et/ou une variance trop élevée selon les cas (cf. Fig. 31 et Fig. 32).

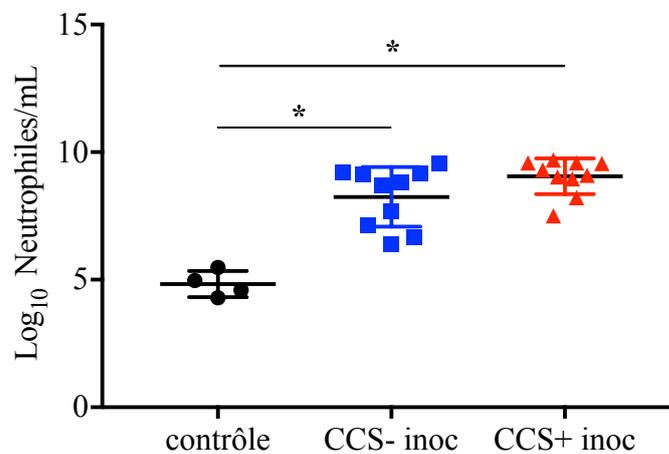


Fig. 31. L'absence de différence significative entre le groupe CCS+ inoculé et le groupe CCS- inoculé concernant la concentration des neutrophiles (transformée en Log10) dans le lavage utérin est possiblement due à un manque de puissance, lequel est plus probablement lié à la faible taille des effectifs (la variance associée aux deux groupes n'étant pas élevée).

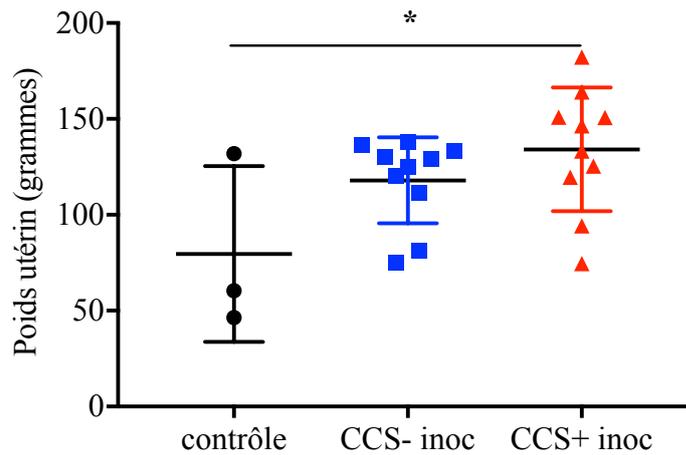


Fig. 32. L'absence de différence significative entre le groupe CCS+ inoculé et le groupe CCS- inoculé concernant le poids utérin est possiblement due à un manque de puissance, lequel est probablement la conséquence d'une faible taille des effectifs et/ou une variance trop élevée.

4. Taille de l'effectif du groupe témoin

L'objectif d'un modèle expérimental est d'extrapoler, par analyse statistique, les résultats obtenus dans un échantillon de la population à la population entière. Or l'extrapolation des résultats du groupe témoin est discutable vu l'effectif de ce groupe (4 brebis). Les échantillons prélevés dans ce groupe servaient de référence pour évaluer l'effet de l'infection, même si cette question ne faisait pas directement partie de l'objectif de l'étude. Les variables mesurées dans ce groupe permettaient de vérifier que celles dont il était prévisible qu'elles soient affectées par l'inoculation, l'étaient effectivement.

B. Résultats principaux et perspectives

Dans la présente étude, alors que les concentrations des différentes sous-populations de leucocytes n'étaient pas significativement différentes entre les deux lignées 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*E. coli*, les titres bactériologiques étaient plus faibles dans la lignée sensible que dans la lignée résistante.

A notre connaissance, cette étude est la première à rechercher l'effet de la sélection conduite sur la base du critère CCS sur la réponse à une infection utérine. L'observation, chez les brebis CCS+, de l'effet défavorable de cette sélection sur la réponse aux infections intramammaires suivie, quelques années plus tard, de la découverte du gène de sensibilité *Socs2* – qui est un gène impliqué dans la régulation de la signalisation cytokinique, fondamentale dans la mise en œuvre de la réponse immunitaire innée – ont conduit à s'interroger sur l'effet d'une telle sélection sur des organes autres que la glande mammaire, en particulier l'utérus.

Le titre bactériologique, 24 heures après l'inoculation intra-utérine d'*E. coli*, plus faible chez les brebis CCS+ suggère un meilleur contrôle de l'infection à ce stade dans cette lignée. Dans une étude évaluant la réponse à une infection intramammaire expérimentale à *S. aureus*, Cremonesi ne met en évidence aucune différence significative de la quantité de bactéries entre les animaux de deux lignées divergentes de chèvres CCS+ et CCS-, et ce jusqu'à 30 heures après l'épreuve infectieuse (Cremonesi et al., 2012). Au contraire, à concentrations de cellules somatiques dans le lait similaires, les brebis CCS+ présentent un titre bactériologique plus élevé que celui des brebis CCS-, 48 heures après l'inoculation intramammaire de *S. aureus* ou *S. epidermis* dans l'étude de Bonnefont (Bonnefont et al., 2011).

Dans notre étude, il n'existe pas de différence significative des concentrations des différentes sous-populations de leucocytes mesurées à partir du contenu utérin dans les deux lignées. Ce résultat inattendu suggère que le recrutement des neutrophiles et monocytes sur le site de l'infection n'est pas différent entre les deux lignées. Ce résultat n'exclut cependant pas complètement une différence de recrutement des cellules dans l'endomètre, même si cette différence est peu probable. L'inoculation d'*E. coli* a provoqué un recrutement marqué des différents types de cellules, en comparaison avec les résultats de l'analyse cytologique obtenus dans le groupe témoin, démontrant que l'inoculation a été efficace à provoquer une endométrite. Si l'on fait le parallèle avec l'infection mammaire, l'étude de Bonnefont dans laquelle l'épreuve infectieuse a été réalisée avec des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *S. epidermis*), le recrutement cellulaire n'était pas significativement différent entre les lignées divergentes, de même que lors de l'infection expérimentale de chèvres par *S. aureus* (Cremonesi et al., 2012). Bien que le critère de sélection utilisé soit la concentration de cellules inflammatoires, une différence de quantité de cellules n'est donc pas systématiquement observée dans les conditions expérimentales.

Dans notre étude les brebis CCS+ sont hétérozygotes pour le gène *Socs2*, c'est-à-dire qu'elles sont porteuses de la forme mutée et de la forme sauvage du gène (les animaux ayant été choisis sur la base du résultat de ce génotypage réalisé préalablement à l'expérience). Or la mutation p.R96C affecte le domaine SH2 de la protéine SOCS-2 et invalide ses propriétés fonctionnelles. En effet, ce domaine est un domaine de reconnaissance des ligands et la fonction de SOCS-2 est d'empêcher, par un mécanisme de compétition, la fixation de la molécule STAT sur des récepteurs cytokiniques, limitant ainsi la signalisation cytokinique. Il a été montré que SOCS-2 exerce un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de la cytokine IL-6 (Fujimoto and Naka, 2003; Piessevaux et al., 2008) et régule également la signalisation TLR/IL-1R. On peut s'attendre par conséquent à ce que la synthèse d'IL-6 chez les brebis CCS+ ne soit pas l'objet d'un rétrocontrôle négatif ou que le rétrocontrôle négatif soit moindre chez les brebis de cette lignée. Or l'IL-6 est impliquée dans le contrôle de l'activité des neutrophiles et des monocytes lors d'infection. On peut alors formuler l'hypothèse que la différence de clairance bactérienne entre les deux lignées est la conséquence, en partie, d'une variation de la réponse des neutrophiles et/ou des monocytes entre les deux lignées. En outre suite à une exposition prolongée au LPS (24h dans l'étude en question), Cronin montre l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif selon laquelle l'IL-6 stimule, par l'intermédiaire du facteur STAT3, la production d'IL-6 et d'IL-8, majorant alors l'effet de ces deux cytokines sur le recrutement des leucocytes et leur activation (Cronin et al., 2016).

L'inoculation d'*E. coli* a provoqué une augmentation de la concentration sanguine des leucocytes chez les brebis CCS- et une augmentation significative de la concentration sanguine de neutrophiles chez les brebis CCS+ et CCS-. Cette observation est en faveur d'une réponse inflammatoire systémique, absente chez les animaux non inoculés, mais qui n'est pas systématique lors d'endométrite. L'absence de différences concernant les populations de leucocytes sanguins entre les deux groupes CCS+ et CCS- suggère que la réponse inflammatoire systémique est similaire dans les deux lignées.

L'analyse d'autres paramètres sanguins (biochimie), tels que l'haptoglobine et la SAA, dont la concentration augmente lors d'infection utérine (Williams et al., 2007), pourra être réalisée ultérieurement ; elle pourrait apporter des informations supplémentaires sur la réponse systémique chez les deux lignées, et éventuellement révéler la présence d'une différence de la réponse inflammatoire.

L'inoculation a provoqué, tous groupes confondus, une augmentation de la température ruminale, particulièrement de 0 à 8h puis de 8h à 24h (dans les groupes inoculés et témoin), tandis que les autres paramètres cliniques étudiés n'ont pas été modifiés de manière significative entre 0 et 24h. Cela suggère qu'une réponse inattendue liée à la manipulation expérimentale, l'intervention pour l'injection intra-tubaire nécessitant une anesthésie générale d'une trentaine de minutes, a probablement été induite, réduisant du même coup la possibilité d'établir une différence de réponse associée entre les deux groupes.

La différence de la quantité de bactéries observée entre les deux lignées ne peut pas être directement reliée à la quantité de cellules recrutées au moment du prélèvement de l'utérus, mais nous ne pouvons pas exclure que cette photographie à un instant donné est la juste illustration de phénomènes plus dynamiques. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la réduction du nombre de bactéries soit liée à un recrutement cellulaire de nature différente, même si nous n'avons pas pu le mettre en évidence, ou selon une cinétique différente. Par ailleurs, ce résultat ne préjuge pas des événements plus tardifs, ni de l'issue de l'infection utérine *in fine*. L'échantillonnage répété sur de longues périodes de temps de l'utérus et de son contenu chez la brebis n'est pas possible, ce qui constitue une limite majeure à la collecte d'informations sur l'évolution de l'infection ; il y a peu d'alternatives à l'euthanasie pour le prélèvement de l'utérus pour la réalisation d'analyses.

Une autre interprétation du résultat obtenu est possible : le moindre développement bactérien pourrait traduire une plus grande réactivité des brebis CCS+ dès le début de l'infection (à un même signal puisque l'inoculum était identique dans les deux groupes), et cette plus grande réactivité pourrait conduire à une inflammation plus intense et plus longue ou difficile à résoudre et éventuellement plus néfaste pour le tissu qui en est le siège. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question.

V. Conclusion

Dans la présente étude, la réponse précoce à l'infection expérimentale par *E. coli* a été étudiée chez deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la base de la concentration de cellules somatiques dans le lait. Alors que les concentrations des différentes sous-populations de leucocytes recueillies dans le lavage utérin n'étaient pas significativement différentes, les titres bactériologiques étaient plus faibles dans la lignée sensible que dans la lignée résistante aux mammites. Ces résultats suggèrent d'une part que la sélection sur le critère CCS a un effet sur la réponse à l'infection intra-utérine, et d'autre part qu'elle serait plutôt favorable chez les brebis CCS+, si les données obtenues au cours de l'analyse des 24 premières heures de l'infection est informative sur l'issue de l'infection après plusieurs jours. Ces résultats témoignent donc d'une différence de réponse immunitaire entre les deux lignées et confortent l'hypothèse selon laquelle les mécanismes sous-jacents de la sélection génétique ne sont pas strictement spécifiques de la glande mammaire, mais sont partagés par l'ensemble des tissus et organes.

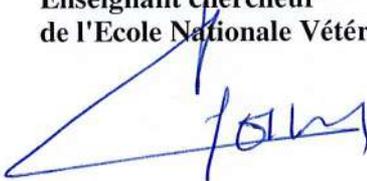
Une étude complémentaire comme par exemple l'analyse du transcriptome de l'endomètre permettra de mieux en appréhender les mécanismes sous-jacents et de révéler les différences de mécanismes entre les deux lignées génétiques.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, **Gilles FOUCRAS**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Emilie HOUPIN** intitulée «**Evaluation expérimentale de la réponse endométriale à l'infection par *Escherichia coli* chez des brebis sélectionnées pour la résistance aux mammites**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 14 septembre 2018
Professeur Gilles FOUCRAS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Olivier PARANT

Professeur Olivier PARANT
Hôpital Paul de Vigulier
Service de Gynécologie Obstétrique
380, avenue de Grande Bretagne
TSA 70034
31059 TOULOUSE Cedex 9

Mlle Emilie HOUPIN
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 06/09/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

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

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

Régine ANDRE-OBRECHT



Références

- Agard, M., Asakrah, S., Morici, L.A., 2013. PGE2 suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00045>
- Alpizar, E., Spicer, L.J., 1994. Effects of Interleukin-6 on Proliferation and Follicle-Stimulating Hormone-Induced Estradiol Production by Bovine Granulosa Cells in Vitro: Dependence on Size of Follicle1. *Biology of Reproduction* 50, 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.1.38>
- Amos, M.R., Healey, G.D., Goldstone, R.J., Mahan, S.M., Düvel, A., Schuberth, H.-J., Sandra, O., Zieger, P., Dieuzy-Labaye, I., Smith, D.G.E., Sheldon, I.M., 2014. Differential Endometrial Cell Sensitivity to a Cholesterol-Dependent Cytolysin Links *Trueperella pyogenes* to Uterine Disease in Cattle1. *Biology of Reproduction* 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115972>
- Bacha, W.J., Bacha, L.M., 2012. *Color atlas of veterinary histology*, 3. ed. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex.
- Bondurant, R.H., 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77 Suppl 2, 101–110.
- Bonnefont, C.M., Toufeer, M., Caubet, C., Foulon, E., Tasca, C., Aurel, M.-R., Bergonier, D., Boullier, S., Robert-Granié, C., Foucras, G., Rupp, R., 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-208>
- Bonnefont, C.M.D., Rainard, P., Cunha, P., Gilbert, F.B., Toufeer, M., Aurel, M.-R., Rupp, R., Foucras, G., 2012. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. *Physiological Genomics* 44, 403–416. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00155.2011>
- Bonnes, G., 1988. *Reproduction des mammifères d'élevage: enseignement agricole : formation professionnelle*. Foucher, Paris.
- Bonnett, B.N., Miller, R.B., Etherington, W.G., Martin, S.W., Johnson, W.H., 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can. J. Vet. Res.* 55, 155–161.
- Borges, Á.M., Healey, G.D., Sheldon, I.M., 2012. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *American Journal of Reproductive Immunology* 67, 526–539. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x>
- Brand, B., Hartmann, A., Repsilber, D., Griesbeck-Zilch, B., Wellnitz, O., Kühn, C., Ponsuksili, S., Meyer, H.H., Schwerin, M., 2011. Comparative expression profiling of *E. coli* and *S. aureus* inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genetics Selection Evolution* 43, 24. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-24>

- Brandwein, S.R., 1986. Regulation of interleukin 1 production by mouse peritoneal macrophages. Effects of arachidonic acid metabolites, cyclic nucleotides, and interferons. *J. Biol. Chem.* 261, 8624–8632.
- Brayman, M., Thathiah, A., Carson, D.D., 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-4>
- Brodzki, P., Kostro, K., Brodzki, A., Lisiecka, U., 2014. Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science* 148, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.021>
- Caillat, H., Bouvier, F., Guéry, E., Martin, P., Rainard, P., Rupp, R., 2011. Response to a divergent selection based on somatic cell counts in Alpine dairy goats.
- Carneiro, L.C., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2016. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reproductive Biology* 16, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.002>
- Chapwanya, A., Meade, K.G., Doherty, M.L., Callanan, J.J., Mee, J.F., O’Farrelly, C., 2009. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology* 71, 1396–1407. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.006>
- Chapwanya, A., Meade, K.G., Doherty, M.L., Callanan, J.J., O’Farrelly, C., 2013. Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.042>
- Chapwanya, A., Meade, K.G., Foley, C., Narciandi, F., Evans, A.C.O., Doherty, M.L., Callanan, J.J., O’Farrelly, C., 2012. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 1028. <https://doi.org/10.1071/RD11153>
- Cheong, S.H., Nydam, D.V., Galvão, K.N., Crosier, B.M., Gilbert, R.O., 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 94, 762–770. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3439>
- Cremonesi, P., Capoferri, R., Pisoni, G., Del Corvo, M., Strozzi, F., Rupp, R., Caillat, H., Modesto, P., Moroni, P., Williams, J.L., Castiglioni, B., Stella, A., 2012. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC Genomics* 13, 540. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-540>
- Cronin, J.G., Kanamarlapudi, V., Thornton, C.A., Sheldon, I.M., 2016. Signal transducer and activator of transcription-3 licenses Toll-like receptor 4-dependent interleukin (IL)-6 and IL-8 production via IL-6 receptor-positive feedback in endometrial cells. *Mucosal Immunology* 9, 1125–1136. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.131>

Cronin, J.G., Turner, M.L., Goetze, L., Bryant, C.E., Sheldon, I.M., 2012. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium. *Biology of Reproduction* 86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092718>

Crowe, M., 2008. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows: Ovarian Activity in Post-partum Beef and Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 20–28. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01210.x>

Davies, D., Meade, K.G., Herath, S., Eckersall, P.D., Gonzalez, D., White, J.O., Conlan, R.S., O'Farrelly, C., Sheldon, I.M., 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 6, 53. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-53>

de Boer, M.W., LeBlanc, S.J., Dubuc, J., Meier, S., Heuwieser, W., Arlt, S., Gilbert, R.O., McDougall, S., 2014. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 3983–3999. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7450>

Deguillaume, L., Geffré, A., Desquilbet, L., Dizien, A., Thoumire, S., Vornière, C., Constant, F., Fournier, R., Chastant-Maillard, S., 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 1776–1783. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4602>

Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J., 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 1845–1854. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4781>

Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J., 2011. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 1339–1346. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3758>

Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J., 2010a. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 5225–5233. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3428>

Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J., 2010b. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 5764–5771. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3429>

Düvel, A., Maaß, J., Heppelmann, M., Hussen, J., Koy, M., Piechotta, M., Sandra, O., Smith, D.G.E., Sheldon, I.M., Dieuzy-Labayé, I., Zieger, P., Schuberth, H.J., 2014. Peripheral blood leukocytes of cows with subclinical endometritis show an altered cellular composition and gene expression. *Theriogenology* 81, 906–917. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.007>

Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 185, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>

- Espejel, M.C., Medrano, A., 2017. Histological Cyclic Endometrial Changes in Dairy Cows: An Overview. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences* 2. <https://doi.org/10.19080/JDVS.2017.02.555577>
- Fischer, C., Drillich, M., Oda, S., Heuwieser, W., Einspanier, R., Gabler, C., 2010. 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. *Reproduction, Fertility and Development* 22, 818. <https://doi.org/10.1071/RD09120>
- Foley, C., Chapwanya, A., Callanan, J.J., Whiston, R., Miranda-CasoLuengo, R., Lu, J., Meijer, W.G., Lynn, D.J., O'Farrelly, C., Meade, K.G., 2015. Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis. *BMC Genomics* 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1967-5>
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2009. *Anatomy and physiology of farm animals*, 7th ed. ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Fujimoto, M., Naka, T., 2003. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends in Immunology* 24, 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.008>
- Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R., Heuwieser, W., 2010. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8, 152. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-152>
- Galvão, K.N., Frajblat, M., Brittin, S.B., Butler, W.R., Guard, C.L., Gilbert, R.O., 2009. Effect of prostaglandin F_{2α} on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 4906–4913. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1984>
- Galvão, K.N., Santos, N.R., Galvão, J.S., Gilbert, R.O., 2011. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.006>
- Gier, H.T., Marion, G.B., 1968. Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.* 29, 83–96.
- Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., Frajblat, M., 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64, 1879–1888. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>
- Gray, C.A., Taylor, K.M., Ramsey, W.S., Hill, J.R., Bazer, F.W., Bartol, F.F., Spencer, T.E., 2001. Endometrial Glands Are Required for Preimplantation Conceptus Elongation and Survival. *Biology of Reproduction* 64, 1608–1613. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1608>
- Hammon, D.S., Evjen, I.M., Dhiman, T.R., Goff, J.P., Walters, J.L., 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>

- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R.P., 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144–150.
- Hartmann, D., Rohkohl, J., Merbach, S., Heilkenbrinker, T., Klindworth, H.P., Schoon, H.A., Hoedemaker, M., 2016. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. *Theriogenology* 85, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.029>
- Healy, L.L., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2015a. Polarized Epithelial Cells Secrete Interleukin 6 Apically in the Bovine Endometrium1. *Biology of Reproduction* 92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.127936>
- Healy, L.L., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2015b. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep07060>
- Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., Williams, E.J., Lilly, S.T., Dobson, H., Bryant, C.E., Sheldon, I.M., 2006. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. *Endocrinology* 147, 562–570. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1113>
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., Gilbert, R.O., Goetze, L., Bryant, C.E., White, J.O., Cronin, J., Sheldon, I.M., 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 55. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-55>
- Herath, S., Williams, E.J., Lilly, S.T., Gilbert, R.O., Dobson, H., Bryant, C.E., Sheldon, I.M., 2007. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* 134, 683–693. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0229>
- Hillreiner, M., Flinspach, C., Pfaffl, M.W., Kliem, H., 2016. Effect of the Ketone Body Beta-Hydroxybutyrate on the Innate Defense Capability of Primary Bovine Mammary Epithelial Cells. *PLOS ONE* 11, e0157774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157774>
- Huau, C., Foucras, G., Tabouret, G., Caubet, C., Bouvier, F., Fassier, T., Rainard, P., Martin, P., Tosser-Klopp, G., Rupp, R., 2015. L'amélioration génétique sur le comptage de cellules somatiques du lait s'accompagne d'une meilleure qualité hygiénique chez la chèvre. Genetic improvement on milk somatic cell counts is associated with better milk hygienic quality in goats.
- Johnson, G.A., Bazer, F.W., Jaeger, L.A., Ka, H., Garlow, J.E., Pfarrer, C., Spencer, T.E., Burghardt, R.C., 2001. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol. Reprod.* 65, 820–828.
- Joosten, I., Van Eldik, P., Elving, L., Van der Mey, G.J.W., 1987. Factors related to the etiology of retained placenta in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 14, 251–262. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(87\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(87)90015-7)
- Karsch, F.J., Battaglia, D.F., Breen, K.M., Debus, N., Harris, T.G., 2002. Mechanisms for Ovarian Cycle Disruption by Immune/inflammatory Stress. *Stress* 5, 101–112. <https://doi.org/10.1080/10253890290027868>

- Karstrup, C.C., Agerholm, J.S., Jensen, T.K., Swaro, L.R.V., Klitgaard, K., Rasmussen, E.L., Krogh, K.M., Pedersen, H.G., 2017. Presence and localization of bacteria in the bovine endometrium postpartum using fluorescence in situ hybridization. *Theriogenology* 92, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.026>
- Kasimanickam, R., Duffield, T., Foster, R., Gartley, C., Leslie, K., Walton, J., Johnson, W., 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Kastelic, J.P., 2014. Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding. *Theriogenology* 81, 952-958.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.018>
- Katz, J.B., Muller, A.J., Prendergast, G.C., 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological Reviews* 222, 206–221. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00610.x>
- Kaushic, C., Zhou, F., Murdin, A.D., Wira, C.R., 2000. Effects of Estradiol and Progesterone on Susceptibility and Early Immune Responses to *Chlamydia trachomatis* Infection in the Female Reproductive Tract. *Infection and Immunity* 68, 4207–4216. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4207-4216.2000>
- Kono, H., Rock, K.L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* 8, 279–289. <https://doi.org/10.1038/nri2215>
- Kovarik, P., Castiglia, V., Ivin, M., Ebner, F., 2016. Type I Interferons in Bacterial Infections: A Balancing Act. *Frontiers in Immunology* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00652>
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2014. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
- LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Bateman, K.G., Keefe, G.P., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2002. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 85, 2223–2236. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74302-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74302-6)
- Lee, S.C., Jeong, J.K., Choi, I.S., Kang, H.G., Jung, Y.H., Park, S.B., Kim, I.H., 2018. Cytological endometritis in dairy cows: diagnostic threshold, risk factors, and impact on reproductive performance. *Journal of Veterinary Science* 19, 301. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.2.301>
- Lewis, G.S., 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.026>
- Lewis, G.S., 2003. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-117>

- Liu, X., Shin, N., Koblish, H.K., Yang, G., Wang, Q., Wang, K., Leffet, L., Hansbury, M.J., Thomas, B., Rupar, M., Waeltz, P., Bowman, K.J., Polam, P., Sparks, R.B., Yue, E.W., Li, Y., Wynn, R., Fridman, J.S., Burn, T.C., Combs, A.P., Newton, R.C., Scherle, P.A., 2010. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 115, 3520–3530. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-246124>
- Machado, F.S., Johndrow, J.E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C.N., Aliberti, J., 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nature Medicine* 12, 330–334. <https://doi.org/10.1038/nm1355>
- Machado, V.S., Bicalho, M.L. de S., Meira Junior, E.B. de S., Rossi, R., Ribeiro, B.L., Lima, S., Santos, T., Kussler, A., Foditsch, C., Ganda, E.K., Oikonomou, G., Cheong, S.H., Gilbert, R.O., Bicalho, R.C., 2014. Subcutaneous Immunization with Inactivated Bacterial Components and Purified Protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* Prevents Puerperal Metritis in Holstein Dairy Cows. *PLoS ONE* 9, e91734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091734>
- Machado, V.S., Oikonomou, G., Ganda, E.K., Stephens, L., Milhomem, M., Freitas, G.L., Zinicola, M., Pearson, J., Wieland, M., Guard, C., Gilbert, R.O., Bicalho, R.C., 2015. The effect of intrauterine infusion of dextrose on clinical endometritis cure rate and reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 3849–3858. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9046>
- MacKintosh, S.B., Schuberth, H.-J., Healy, L.L., Sheldon, I.M., 2013. Polarised bovine endometrial epithelial cells vectorially secrete prostaglandins and chemotactic factors under physiological and pathological conditions. *Reproduction* 145, 57–72. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0253>
- McDougall, S., 2001. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *New Zealand Veterinary Journal* 49, 150–158. <https://doi.org/10.1080/00480169.2001.36223>
- McDougall, S., Macaulay, R., Compton, C., 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 99, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.017>
- Meira, E.B.S., Henriques, L.C.S., Sá, L.R.M., Gregory, L., 2012. Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 95, 6969–6973. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4950>
- Moresco, E.M.Y., LaVine, D., Beutler, B., 2011. Toll-like receptors. *Current Biology* 21, R488–R493. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>
- Muller, L.D., Owens, M.J., 1974. Factors Associated with the Incidence of Retained Placentas. *Journal of Dairy Science* 57, 725–728. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84956-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84956-8)
- Noletto, P.G., Saut, J.P.E., Sheldon, I.M., 2017. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. *Journal of Dairy Science* 100, 2207–2212. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12023>

- Pascottini, O.B., Hostens, M., Sys, P., Vercauteren, P., Opsomer, G., 2017. Risk factors associated with cytological endometritis diagnosed at artificial insemination in dairy cows. *Theriogenology* 92, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.004>
- Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., Tavernier, J., 2008. The many faces of the SOCS box. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.006>
- Pinedo, P.J., Galvão, K.N., Seabury, C.M., 2013. Innate immune gene variation and differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows. *Theriogenology* 80, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.027>
- Plöntzke, J., Madoz, L., De la Sota, R., Heuwieser, W., Drillich, M., 2011. Prevalence of Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Grazing Dairy Cattle in Argentina: Clinical Endometritis in the Dairy Cow. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 520–526. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01700.x>
- Posselt, G., Schwarz, H., Duschl, A., Horejs-Hoeck, J., 2011. Suppressor of Cytokine Signaling 2 Is a Feedback Inhibitor of TLR-Induced Activation in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 187, 2875–2884. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003348>
- Potter, T.J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P.J., Sheldon, I.M., 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.023>
- Price, J.C., Bromfield, J.J., Sheldon, I.M., 2013. Pathogen-Associated Molecular Patterns Initiate Inflammation and Perturb the Endocrine Function of Bovine Granulosa Cells From Ovarian Dominant Follicles via TLR2 and TLR4 Pathways. *Endocrinology* 154, 3377–3386. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1102>
- Prunner, I., Wagener, K., Pothmann, H., Ehling-Schulz, M., Drillich, M., 2014. Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology* 82, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.015>
- Pugh, D.G., Baird, A.N. (Eds.), 2012. *Sheep and goat medicine*, 2. ed. ed. Elsevier/Saunders, Maryland Heights, Mo.
- Rainard, P., Foucras, G., Boichard, D., Rupp, R., 2018. Invited review: Low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. *Journal of Dairy Science* 101, 6703–6714. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14593>
- Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Bisinotto, R.S., Monteiro, A.P.A., Favoreto, M., Ayres, H., Marsola, R.S., Martinez, N., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *Journal of Dairy Science* 96, 5682–5697. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6335>

- Roche, J.F., Crowe, M.A., Boland, M.P., 1992. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Animal Reproduction Science* 28, 371–378. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90123-U](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90123-U)
- Rupp, R., Bergonier, D., Dion, S., Hygonenq, M.C., Aurel, M.R., Robert-Granié, C., Foucras, G., 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *Journal of Dairy Science* 92, 1203–1219. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1435>
- Rupp, R., Senin, P., Sarry, J., Allain, C., Tasca, C., Ligat, L., Portes, D., Woloszyn, F., Bouchez, O., Tabouret, G., Lebastard, M., Caubet, C., Foucras, G., Tosser-Klopp, G., 2015. A Point Mutation in Suppressor of Cytokine Signalling 2 (Socs2) Increases the Susceptibility to Inflammation of the Mammary Gland while Associated with Higher Body Weight and Size and Higher Milk Production in a Sheep Model. *PLOS Genetics* 11, e1005629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005629>
- Saut, J.P.E., Healey, G.D., Borges, A.M., Sheldon, I.M., 2014. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction* 148, 593–606. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>
- Šavc, M., Duane, M., O’Grady, L.E., Somers, J.R., Beltman, M.E., 2016. Uterine disease and its effect on subsequent reproductive performance of dairy cattle: a comparison of two cow-side diagnostic methods. *Theriogenology* 86, 1983–1988. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.018>
- Shaw, A.C., Goldstein, D.R., Montgomery, R.R., 2013. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 13, 875–887. <https://doi.org/10.1038/nri3547>
- Sheldon, I., Dobson, H., 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science* 82–83, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.006>
- Sheldon, I.M., 2015. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 27, 72. <https://doi.org/10.1071/RD14305>
- Sheldon, I.M., 2004. The postpartum uterus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20, 569–591. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.008>
- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H.-J., 2009. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biology of Reproduction* 81, 1025–1032. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Healey, G.D., Gabler, C., Heuwieser, W., Strey, D., Bromfield, J.J., Miyamoto, A., Fergani, C., Dobson, H., 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction* 148, R41–R51. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0163>
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>

- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A., Dobson, H., 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.* 148, 172–175.
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Dobson, H., 2002a. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* 151, 531–534.
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., Dobson, H., 2002b. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123, 837–845.
- Sheldon, I.M., Owens, S.E., 2017. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Animal Reproduction* 14, 622–629. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1006>
- Sheldon, I.M., Rycroft, A.N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J.J., Chandler, A., Roberts, M.H., Price, S.B., Gilbert, R.O., Simpson, K.W., 2010. Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *PLoS ONE* 5, e9192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009192>
- Sheldon, I.M., Williams, E.J., Miller, A.N.A., Nash, D.M., Herath, S., 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal* 176, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
- Slama, H., Vaillancourt, D., Goff, A.K., 1991. Pathophysiology of the puerperal period: Relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow. *Theriogenology* 36, 1071–1090. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90332-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90332-8)
- Spicer, L.J., 1998. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Inhibits Steroidogenesis of Bovine Ovarian Granulosa and Thecal Cells In Vitro: Involvement of TNF- α Receptors. *Endocrine* 8, 109–116. <https://doi.org/10.1385/ENDO:8:2:109>
- Tizard, I.R., 2013. *Veterinary immunology*, 9th ed. ed. Elsevier/Saunders, St. Louis, Mo.
- Toni, F., Vincenti, L., Ricci, A., Schukken, Y.H., 2015. Postpartum uterine diseases and their impacts on conception and days open in dairy herds in Italy. *Theriogenology* 84, 1206–1214. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.022>
- Toufeer, M., Bonnefont, C.M.D., Foulon, E., Caubet, C., Tasca, C., Aurel, M.-R., Robert-Granié, C., Rupp, R., Foucras, G., 2011. Gene Expression Profiling of Dendritic Cells Reveals Important Mechanisms Associated with Predisposition to *Staphylococcus* Infections. *PLoS ONE* 6, e22147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022147>
- Turner, M.L., Cronin, J.G., Healey, G.D., Sheldon, I.M., 2014. Epithelial and Stromal Cells of Bovine Endometrium Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides In Vitro via Toll-Like Receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology* 155, 1453–1465. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1822>
- Turner, M.L., Cronin, J.G., Noletto, P.G., Sheldon, I.M., 2016. Glucose Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and Innate Immunity in the Bovine Endometrium. *PLOS ONE* 11, e0151416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151416>

- Wang, X., Quinn, P.J., Yan, A., 2015. Kdo2-lipid A: structural diversity and impact on immunopharmacology. *Biological Reviews* 90, 408–427. <https://doi.org/10.1111/brv.12114>
- Williams, E.J., Fischer, D.P., Noakes, D.E., England, G.C.W., Rycroft, A., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68, 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.056>
- Williams, E.J., Fischer, D.P., Pfeiffer, D.U., England, G.C.W., Noakes, D.E., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63, 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.017>
- Xu, X.J., Reichner, J.S., Mastrofrancesco, B., Henry, W.L., Albina, J.E., 2008. Prostaglandin E2 Suppresses Lipopolysaccharide-Stimulated IFN- Production. *The Journal of Immunology* 180, 2125–2131. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2125>
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., Leibold, W., 2003. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 60, 209–223. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01376-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01376-6)

Annexes

Annexe 1. Tableau illustrant la multitude des valeurs de seuils retenus pour définir l'endométrite subclinique. Adapté de (de Boer et al., 2014).

Prévalence	-	-	-	11,1%	35,1%	34%	-
Proportion de granulocytes neutrophiles retenue pour définir l'endométrite subclinique	6,7%	6%	4%	8%	18%	10%	6,5%
Critère utilisé pour déterminer le seuil de granulocytes neutrophiles	Gestation à 90 jpp	Gestation à 120 jpp	Gestation à 120 jpp	Gestation à 150 jpp	Gestation à 132 jpp	Gestation à 132 jpp	Gestation à 300 jpp
Affections utérines exclues	Métrie, endométrite clinique, rétention des	Non	Non	Non	Endométrite clinique	Endométrite clinique	Non
Taille de l'échantillon	285	1044	1044	221	228	228	168
Jours postpartum lors du diagnostic	21 à 47	35	56	28 à 41	20 à 33	34 à 47	21 à 34
Technique de diagnostic	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre
Références	Couto et al., 2013	Dubuc et al., 2010	Dubuc et al., 2010	Bartlund et al., 2008	Kasimanicka m et al., 2004	Kasimanicka m et al., 2004	Deguillaume et al., 2012

-	-	-	-	-	31,1%	27,8%	18,7%	21%	25,9%
9%	7%	8,5%	6,5%	4%	14%	1%	6%	5%	10%
-	-	Gestation à 150 jpp	Gestation à 150 jpp	Gestation à 150 jpp	Gestation à 200 jpp	-	-	-	-
Non	Non	Pyomètre, adhésions, abcès	Pyomètre, adhésions, abcès	Pyomètre, adhésions, abcès	-	-	Non	-	-
303	303	445	445	445	407	873	1295	383	779
28	42	21	35	49	28	60 à 145	32 à 38	20 à 30	40 à 60
Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush de l'endomètre	Lavage utérin	Lavage utérin	Lavage utérin	Cytobrush de l'endomètre	Technique cytotaïpe	Cytobrush de l'endomètre	Cytobrush	Lavage utérin
McDougall, 2011	McDougall, 2011	Galvão et al., 2009	Galvão et al., 2009	Galvão et al., 2009	(Lee et al., 2018)	(Pascotini et al., 2017)	(Dubuc et al., 2010b)	(Prunner et al., 2014)	(Cheong et al., 2011)

Annexe 2. Tableau illustrant les prévalences de l'endométrite clinique selon les études.

Références	Jours postpartum	Prévalence	Technique utilisée pour le diagnostic de l'endométrite clinique	Critères utilisés pour le diagnostic de l'endométrite clinique
(Dubuc et al., 2010b)	32 à 38	14,6%	Scoring du contenu vaginal collecté par Metricheck® (selon l'échelle McDougall et al., 2007)	Score du contenu vaginal ≥ 3
(Dubuc et al., 2010a)	32 à 38	9,4%	Scoring du contenu vaginal collecté par Metricheck® (selon l'échelle McDougall et al., 2007)	Score du contenu vaginal ≥ 3
	53 à 59	7,7%		
(Plöntzke et al., 2011)	18 à 38	35%	Scoring du contenu vaginal collecté manuellement (selon l'échelle Plöntzke et al., 2011)	Score du contenu vaginal 1, 2 ou 3
	32 à 52	18%		
(Ribeiro et al., 2013)	25 à 31	15%	Scoring du contenu vaginal collecté par Metricheck® (selon l'échelle McDougall et al., 2007)	Score du contenu vaginal > 2
(Machado et al., 2015)	27 à 33	14,1%		Score du contenu vaginal ≥ 3
(LeBlanc et al., 2002)	20 à 33	16,9%	Scoring du contenu vaginal et/ou mesure du diamètre cervical par palpation transrectale	Écoulement utérin purulent ou d'odeur fétide ou diamètre cervical $> 7,5$ cm
	26 à 33			Écoulement utérin mucopurulent
(Williams et al., 2005)	21	31%	Scoring du contenu vaginal collecté manuellement (selon l'échelle Williams et al., 2005)	Score du contenu vaginal 3
	28	17%		Score du contenu vaginal 2 ou 3

Endométrite chez des brebis sélectionnées pour la résistance aux mammites (lignées CCS): modèle expérimental et caractérisation de la réponse

SUIVI CLINIQUE

Numéro de brebis : 140218 Lignée : CCS + Groupe inoculé

Nom de l'opérateur :

Heure inoculation :

	Mercredi 20 Avril 2016				Jeudi 21 Avril 2016
	t _{pré} -inoculation =	t _{0h} post-inoculation =	t _{8h} post-inoculation =	t _{12h} post-inoculation =	t _{24h} post-inoculation =
Température ruminale (°C)					
Fréquence cardiaque (bpm)					
Fréquence respiratoire (rpm)					
Fréquence ruminale (nombre de contractions/5min)					
Autres					

DONNEES PARACLINIQUES

Mesure de la concentration sanguine en bêtahydroxybutyrate avant inoculation : mmol/L

Prise de sang (tube hépariné, tube sec, tube EDTA) : t₀ t_{2h} p.i. t_{24h} p.i.

Annexe 4. Moyennes et écarts-types (SD) pour les variables « Fréquence cardiaque à t0 », « Fréquence cardiaque à t24 », « Fréquence respiratoire à t0 » et « Fréquence respiratoire à t24 ».

<i>Variable</i>	<i>Contrôle</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>CCS-</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>CCS+</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>
<i>Fréquence cardiaque t0 en bpm</i>	90 16.49 (4)	80.89 21.98 (9)	76.2 18.1 (10)
<i>Fréquence cardiaque t24 en bpm</i>	104 25.92 (4)	82.8 21 (10)	78.8 14.73 (10)
<i>Fréquence respiratoire t0 en mpm</i>	35 6 (4)	29.78 5.333 (9)	28 7.303 (10)
<i>Fréquence respiratoire t24 en mpm</i>	36 5.657 (4)	32.44 12.28 (9)	31.4 11.7 (10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis ; bpm : battements par minute ; mpm : mouvements par minute.

Annexe 5. Moyennes et écarts-types (SD) pour la variable 'Poids utérin'.

<i>Variable</i>	Contrôle	CCS-	CCS+
	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>
<i>Poids utérin (grammes)</i>	79.57 45.86 (3)	118 22.4 (10)	134.1 32.23 (10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis.

Annexe 6. Observations faites lors du prélèvement de l'utérus et des ovaires chez certaines brebis.

Numéro d'identification	Volume de liquide intra-utérin (mL)	Nombre de corps jaunes (statut)		Poids utérus (grammes)	Remarques
		Ovaire gauche	Ovaire droit		
130305	28	-	-	164,10	
130393	22,5	1 (lutéolysé)	1 (lutéolysé)	137,85	
120332	25	2 (résiduels)	-	146,35	
100473	20	1 (lutéolysé)	1 (lutéolysé)	125,06	Abcès caséux en région
100489	22	1 (régressé)	-	150,92	préscapulaire gauche et abcès dans le nœud lymphatique préscapulaire
130403	22,5	-	1 (actif ?)	133,25	
130022	22,5	2 (lutéolysés)	-	119,64	Oviducte droit nécrotique
120003	25	-	2	111,36	
120140	20	1 (très dégénéré)	-	182,24	Utérus « chaud »
120397	20	-	-	129,31	Hémorragie interne

Annexe 7. Moyennes et écarts-types pour les variables « Concentration de leucocytes à t0 », « Concentration de leucocytes à t24 », « Concentration de neutrophiles à t0 », « Concentration de neutrophiles à t24 », « Concentration de monocytes à t0 », « Concentration de monocytes à t24 », « Concentration de lymphocytes à t0 » et « Concentration de lymphocytes à t24 ».

<i>Variable</i>	<i>Contrôle</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>CCS-</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>CCS+</i> <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>
<i>Leucocytes à t0 (/L)</i>	6842500000 2276684358 (4)	7224444444 2215914659 (9)	6126000000 1186462529 (10)
<i>Leucocytes à t24 (/L)</i>	8212500000 800557098 (4)	10088000000 3529097461 (10)	8278000000 1747454021 (10)
<i>Neutrophiles à t0 (/L)</i>	3015000000 2397964415 (4)	2364444444 746275939 (9)	2027000000 823016808 (10)
<i>Neutrophiles à t24 (/L)</i>	4830000000 844195870 (4)	5879000000 3000216474 (10)	4384000000 1941123386 (10)
<i>Monocytes à t0 (/L)</i>	1800000000 147196014 (4)	227777778 305031874 (9)	2020000000 113411738 (10)
<i>Monocytes à t24 (/L)</i>	1725000000 131497782 (4)	2400000000 269402631 (10)	1800000000 81103500 (10)
<i>Lymphocytes à t0 (/L)</i>	3350000000 1017349497 (4)	3571111111 1277247474 (9)	3346000000 890745007 (10)
<i>Lymphocytes à t24 (/L)</i>	2847500000 690283758 (4)	3289000000 1291385561 (10)	3206000000 968666896 (10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis.

Annexe 8. Moyennes et écarts-types pour les variables « Concentration de plaquettes à t0 » et « Concentration de plaquettes à t24 »

<i>Variable</i>	Contrôle	CCS-	CCS+
	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	<i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>
<i>Plaquettes à t0 (10³/μL)</i>	358,8	374,2	337,5
	91,46	77,85	146,1
	(4)	(9)	(10)
<i>Plaquettes à t24 (10³/μL)</i>	369	384,6	389,3
	125,9	130,7	136,7
	(4)	(9)	(10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis.

Annexe 9. Moyennes et écarts-types pour les variables « Concentration bactérienne en UFC/mL » et « Concentration bactérienne en Log10 UFC/mL ».

<i>Variable</i>	CCS- <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>	CCS+ <i>Moyenne</i> <i>SD</i> <i>(n)</i>
<i>UFC (/mL)</i>	54587091 98742949 (10)	9117523 16647054 (10)
<i>Log10 UFC (/mL)</i>	7,041 0,9501 (10)	5,665 1,629 (10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis.

Annexe 10. Moyennes et écarts-types pour les variables ‘Concentration de cellules totales’, ‘Concentration de neutrophiles’, ‘Concentration de monocytes’ et ‘Concentration de lymphocytes’ dans le lavage utérin.

<i>Variable</i>	Contrôle Moyenne SD (n)	CCS- Moyenne SD (n)	CCS+ Moyenne SD (n)
<i>Cellules totales (/mL)</i>	674000	1020664000	2325800000
	470146 (4)	1228414313 (10)	1845817723 (10)
<i>Neutrophiles (/mL)</i>	113325	930735200	2163145200
	128934 (4)	1145998428 (10)	1758333915 (10)
<i>Monocytes (/mL)</i>	4000	76949120	72507000
	2972 (4)	109938873 (10)	103569026 (10)
<i>Lymphocytes (/mL)</i>	551750	83787400	146448000
	376767 (4)	90629491 (10)	124169975 (10)

Légende. SD : standard deviation ; n : nombre de brebis.

Nom, Prénom : Houpin Emilie

Titre : ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE DE LA RÉPONSE ENDOMÉTRIALE À L'INFECTION PAR *ESCHERICHIA COLI* CHEZ DES BREBIS SÉLECTIONNÉES POUR LA RÉSISTANCE AUX MAMMITES

Résumé : L'endométrite est une affection multifactorielle causée par la colonisation bactérienne de l'utérus dans le postpartum immédiat. La sélection génétique sur le critère de la concentration des cellules (CCS) dans le lait a pour effet d'augmenter la résistance aux mammites dans l'espèce ovine. Cependant, les effets de cette sélection sur la réponse à d'autres infections restent à déterminer. Pour cela, une infection expérimentale de l'utérus par *Escherichia coli* a été provoquée chez des brebis issues de la sélection divergente sur le critère CCS. Alors que les concentrations des différentes sous-populations de leucocytes recrutés dans la lumière utérine suite à l'infection ne diffèrent pas significativement entre les deux lignées, la quantité de bactéries mesurée chez les brebis de la lignée CCS+ prédisposée aux mammites, était significativement moindre. Cette différence incite à poursuivre les investigations pour identifier les mécanismes sous-jacents à cette différence de réponse anti-infectieuse de l'endomètre.

Mots-clés : endométrite, mammite, sélection génétique, CCS, brebis.

Last and first name : Houpin Emilie

Title : ENDOMETRIAL RESPONSE TO AN EXPERIMENTAL CHALLENGE WITH *ESCHERICHIA COLI* IN DAIRY EWE DIVERGENTLY SELECTED FOR MASTITIS RESISTANCE

Abstract : Endometritis is a multifactorial condition caused by bacteria invading the uterus immediately following parturition. Divergent selection based on somatic cell counts (SCC) conducted in a dairy sheep population has led to increased mastitis resistance. However, crossed effects on immune mechanisms to other infectious diseases are unknown. For that purpose, an experimental challenge of the uterus with *Escherichia coli* was settled in two groups of dairy ewes divergently selected on the SCC criterion. While the sub-populations of leucocytes recruited in the uterine lumen after the challenge weren't significantly different between SCC+ and SCC- ewes, the bacteriological titer was significantly lower in SCC+ ewes. This observation warrants further analysis to understand underlying mechanisms of this difference of immune response to endometritis.

Key words : mastitis, endometritis, divergent selection, SCC, dairy sheep