

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Le profil de virulence d'*Escherichia coli* intra-utérin permettrait de prédire la métrite postpartum chez la vache laitière

Par

Flavien NDONGO KASSÉ

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître en sciences (M.Sc.)
vétérinaires option microbiologie**

Décembre 2013

©Flavien NDONGO KASSÉ, 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Le profil de virulence d'*Escherichia coli* intra-utérin permettrait de prédire la
métrite postpartum chez la vache laitière**

Présenté par

Flavien NDONGO KASSÉ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr David Francoz: Président rapporteur

Dr John Fairbrother : Directeur de recherche

Dr Jocelyn Dubuc : Codirecteur de recherche

Dr Younès Chorfi: Membre du jury

RÉSUMÉ

Les objectifs de cette étude ont été de : (1) déterminer s'il existe une association entre la présence intra-utérine d'*Escherichia coli* dans la 1^{ère} semaine postpartum et le développement de la métrite postpartum, (2) déterminer s'il y a une association entre les gènes de virulence d'*E. coli* et la métrite postpartum, et (3) d'évaluer si les analyses bactériologiques (bactéries et gènes de virulence d'*E. coli*) pourraient prédire la métrite postpartum chez la vache laitière. Des écouvillons utérins ont été prélevés dans la première semaine postpartum sur 486 vaches de race Holstein et soumis au laboratoire pour détection de *E. coli*. Les gènes de virulence d'*E. coli* ont été identifiés par la technique d'hybridation des sondes radioactives. Un total de 252 vaches (52%) ont été positives à *E. coli* et 67 vaches positives à la métrite postpartum (13,7%). Les vaches positives à *E. coli* intra-utérin dès la première semaine postpartum avaient un risque 2,6 fois plus élevé de développer la métrite postpartum que les vaches sans *E. coli*. La plupart des *E. coli* possédaient un ou plusieurs gènes des *E. coli* d'origine extra-intestinale (ExPEC) dont *fimH* (89%), *HlyE* (87%) et *iss* (70%). Parmi les autres gènes ExPEC, on a retrouvé *sitA* (23%), *fepC* (20%) *hral* (20%) *malX* (14%) *tsh* (11%) et bien d'autres. Les gènes de virulence *kpsMTII* et *hral* ont été associés à la métrite postpartum avec un rapport de cote de 4,3 chacun. La présence d'*E. coli* dans l'utérus avait une valeur prédictive positive de 18% tandis que la présence des gènes *kpsMTII* et *hral* avait une valeur prédictive positive de 36% et 31% respectivement. La détection de certains gènes de virulence d'*E. coli* dans les prélèvements utérins pourrait renseigner sur le risque de développement de la métrite postpartum chez la vache laitière. Les études ultérieures pourraient tester encore plus de gènes et viser à développer des tests de dépistage simple, facilement et rapidement applicable à la ferme.

Mots clés: *E. coli*, gène de virulence, métrite postpartum, vache laitière

ABSTRACT

The objectives of this study were to (1) determine whether there is an association between the presence of intra-uterine *Escherichia coli* in the first week postpartum and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, (2) determine whether there is an association between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis, and (3) to assess whether the presence of these *E. coli* virulence genes could predict the occurrence of postpartum metritis in dairy cows. Uterine swabs were collected in the first week postpartum from 486 Holstein cows and submitted to the laboratory for detection of *E. coli*. Virulence genes of *E. coli* were identified using the radioactive probe hybridization method. A total of 252 cows (52%) were positive for intra-uterine *E. coli* and 67 cows (13.7%) were positive for postpartum metritis. Cows positive for intra-uterine *E. coli* in the first week postpartum had 2.6 times the odds of developing postpartum metritis compared to negative cows. Most intra-uterine *E. coli* possessed one or more ExPEC genes, among which *FimH* (89%), *hlyE* (87%), and *iss* (70%). Other ExPEC genes such as *sitA* (23%), *fePC* (20%), *hral* (20%), *malX* (14%), *tsh* (11%) and others were found with low prevalence. The presence of the virulence genes *kpsMTII* and *hral* was associated with 4.3 times each the odds of developing postpartum metritis compared to negative cows. The presence of *E. coli* in the uterus had a positive predictive value of 18%, while the presence of the genes *kpsMTII* and *hral* had a positive predictive value of 36% and 31% respectively. The detection of certain virulence genes of *E. coli* in uterine swabs could inform about the risk of developing postpartum metritis in dairy cattle. Further studies could test more virulence genes and aim at developing molecular tests that would be simple, quickly and easily applicable on farm.

Key words: *E. coli*, virulence genes, postpartum metritis, dairy cow

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xii
INTRODUCTION	2
REVUE DE LITTÉRATURE	4
1 Étude épidémiologique et clinique des métrites postpartum	4
1.1 Définition de la métrite postpartum	4
1.2 Étude épidémiologique de la métrite postpartum	4
1.2.1 Facteurs de risque extrinsèques.....	4
1.2.2 Facteurs de risque intrinsèques	5
1.3 Étude clinique de la métrite postpartum	7
1.4 Les méthodes de diagnostic de la métrite postpartum.	7
1.4.1 L'examen de l'état général de l'animal	8
1.4.2 La palpation transrectale de l'utérus	8
1.4.3 L'examen du contenu vaginal.....	8
1.4.4 Les tests bactériologiques	8
1.5 Pathogénie de la métrite postpartum.....	9
2 <i>Escherichia coli</i>, une espèce bactérienne polymorphe	11
2.1 Méthodes de classification des souches d' <i>E. coli</i>	12
2.1.1 Classification par sérotype	12
2.1.2 Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE).....	13
2.1.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)	14
2.1.4 Pulsed-field gel electrophoreses (PFGE)	14
2.1.5 Classification par groupes phylogénétiques.....	15
2.2 Diversité génétique d' <i>Escherichia. coli</i>	18
2.3 Les <i>Escherichia. coli</i> pathogènes	19

2.3.1 Les <i>E. coli</i> pathogènes du tractus intestinal	21
2.3.2 Les <i>E. coli</i> pathogènes extra intestinal (ExPEC)	22
2.4 Pathogénie des infections par les ExPEC	23
2.5 Les facteurs de virulence des ExPEC et les gènes associés.....	25
2.5.1 Les principaux systèmes d'acquisition du fer.....	25
2.5.2 Les adhésines	27
2.5.3 La capsule K1.....	28
2.5.4 Les toxines	28
2.5.4 Les gènes de virulence des ExPEC d'origine utérine.....	29
3 Problématique, hypothèses et objectifs de l'étude.....	30
3.1 Problématique	30
3.2 Hypothèses.....	30
3.3 Objectifs de l'étude:	31
ARTICLE EN PREPARATION.....	33
ABSTRACT	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIALS AND METHODS.....	37
1 Farm selection and sample collection	37
2 Bacteria isolation	38
3 Identification of <i>E. coli</i> virulence genes by colony hybridization	38
4 Postpartum metritis diagnosis.....	39
5 Statistical analyses.....	39
5.1 Univariable analyses.....	39
5.1.1 Association between risk factors and postpartum metritis.....	40
5.1.2 Association between bacterial species and postpartum metritis	40
5.1.3 Association between <i>E. coli</i> virulence genes and postpartum metritis	40
5.2 Multivariable analyses.....	41
RESULTS.....	42
1 Descriptive Statistics	42
1.2 <i>Escherichia coli</i> virulence genes	42

2 Univariable associations	43
2.1 Association between bacterial species and postpartum metritis.....	43
2.2 Association between <i>E. coli</i> virulence genes and postpartum metritis.....	43
3 Multivariable associations	43
3.1 Multivariable association between bacterial species and postpartum metritis	43
3.2 Multivariable association between <i>E. coli</i> virulence genes and postpartum metritis	43
DISCUSSION	45
CONCLUSION	49
ACKNOWLEDGMENTS	50
REFERENCES	51
DISCUSSION GÉNÉRALE	66
CONCLUSION DU MÉMOIRE	72
BIBLIOGRAPHIE	73
Annexe 1:	84
Prévalence des groupes phylogénétiques chez le <i>E. coli</i> d'origine utérine	84

LISTE DES TABLEAUX

- REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau I: Potentiels gènes de virulence des <i>E. coli</i>	19
Tableau II: Gènes de virulence déjà mis en évidence chez les <i>E. coli</i> intra-utérin chez la vache laitière	29

- ARTICLE EN PRÉPARATION

Table I: Summary of primer sets used in uniplex PCR for amplification of probes of the 40 virulence genes tested in this study	57
Table II: Bacterial species isolated from uterus of Holstein dairy cows (in 6 farms) without postpartum metritis in the first week postpartum.....	60
Table III: Univariable association between the presence of bacterial species in the uterus of Holstein dairy cows in the 1 st week postpartum and the development of postpartum metritis in the subsequent weeks.	61
Table IV: Univariable association between the presence of <i>E. coli</i> carrying certain virulence genes in the uterus of Holstein dairy cows, in the 1 st week postpartum, and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, in cows positive for intrauterine <i>E. coli</i>	62
Table V: Univariable association between the presence of <i>E. coli</i> carrying certain virulence genes in the uterus of Holstein dairy cows, in the 1 st week postpartum, and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, in cows positive and negative for intrauterine <i>E. coli</i>	63
Table VI: Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of using intrauterine <i>E. coli</i> and the genes <i>kpsMTII</i> and <i>hral</i> , to predict postpartum metritis in Holstein dairy cows in the 1 st week postpartum.....	64

LISTE DES FIGURES**- REVUE DE LITTÉRATURE**

Figure 1: Relation entre la prévalence de <i>E. coli</i> à 1 jour postpartum et la prévalence d'autres bactéries à 14 Jours postpartum.....	11
Figure 2. Diversité phylogénétique des <i>E. coli</i>	17
Figure 3. La plasticité génomique des <i>E. coli</i>	18
Figure 4: Pathogénie des infections des ExPEC	24

-ARTICLE EN PRÉPARATION

Figure 1: Distribution of the 32 virulence genes identified in intrauterine <i>E. coli</i> isolated from 163 Holstein dairy cows in the first week postpartum, among cows with postpartum metritis and cows without postpartum metritis.....	65
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Attachement et effacement
AFLP	Amplified fragment length polymorphisms
APEC	Avian Pathogenic <i>E. coli</i>
CNF	Cytotoxique necrotic factor
DHIA	Dairy her dimprovement
DSA	Dossier de santé animale
DSAHR	Dossier de santé animale/Animal health record
ECOR	<i>E. coli</i> collection of reference
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxinogenic <i>E. coli</i>
ExPEC	Extraintestinal Pathogenic <i>E. coli</i>
FMV	Faculté de médecine vétérinaire
IA	Insémination artificielle
ICOPHAI	International Conference for Pathogens at Human Animal Interface
LEE	Locus of enterocytes effacement
LPS	Lypopolysaccharide

LT	Thermo labile toxins
MLEE	Multilocusenzyme electrophoreses
MLST	Multilocussequence typing
MNEC	Meningitis associated <i>E. coli</i>
OIE	Office International des Epizooties
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse field Gel Electrophoreses
PNN	Polynucleaire Neutrophile
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEPEC	Septicemic Pathogenic <i>E. coli</i>
ST	Heat Stable Toxin
STEC	Shiga like Toxins producer <i>E. coli</i>
TSB	Tryptic Soy Broth
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>
USA	United States of America
UTI	Urinary Tract Infection
VNTR	Variable number of tandem repeat
VT	Vérottoxine

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux Drs John Morris Fairbrother et Jocelyn Dubuc pour la confiance qu'ils ont eue en moi, en me confiant ce projet, et en m'acceptant dans leurs laboratoires. Merci pour l'intérêt que vous avez démontré pour ce travail en investissant énormément de temps dans ma formation scientifique et en m'encourageant à viser l'excellence scientifique.

Je tiens également à remercier Dre Marie Archambault et Dr. Réjean Lefebvre, pour avoir accepté de faire partie de mon comité conseil. Merci pour vos conseils et pour votre participation à la qualité scientifique de ce travail.

Je voudrais dire un grand merci à Dre Ghyslaine Vanier et à Brigitte Lehoux, pour leur disponibilité, leur formation et leur implication sans faille dans ce projet.

Je remercie également Jean-Philippe Pelletier pour son assistance technique et sa disponibilité.

Je remercie toutes les techniciennes du laboratoire de diagnostic de la FMV, les agents de recherche, les techniciennes administratives (Jacinthe Lachance) et les étudiants du laboratoire EcL pour leur contribution et collaboration à la réussite de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury de mon mémoire pour leur contribution à la qualité scientifique de ce travail.

Je voudrais également remercier tous mes amis étudiants du GREMIP et en dehors du cadre universitaire pour leur soutien moral, leurs conseils et leur réconfort.

INTRODUCTION

Les vaches laitières sont parmi les animaux d'élevage les plus susceptibles à une contamination bactérienne de l'utérus après la parturition (Griffin et al., 1974a). Pendant le vêlage, le col de l'utérus se dilate pour permettre le passage du fœtus et cela permet aux micro-organismes présents sur la peau, les fèces et dans l'environnement d'entrer dans l'utérus (Sheldon and Dobson, 2004). Ainsi, 90% à 95% des vaches ont un utérus contaminé par des bactéries durant les 2 premières semaines suivant le vêlage (Paisley et al., 1986; Sheldon, 2004). La plupart des animaux sont capables de gérer cette infection bactérienne grâce à leur système immunitaire, mais dans 30% à 40% des cas, ces bactéries peuvent causer une infection aiguë de l'utérus connue sous le nom de métrite postpartum (Griffin et al., 1974a; LeBlanc et al., 2002).

La métrite postpartum est une inflammation des couches endométriales et musculaires de l'utérus (Palmer, 2003). Les cas les plus graves surviennent durant les 10 à 14 premiers jours après le vêlage et se manifestent par un écoulement vaginal rouge-brun nauséabond, de la fièvre et des signes généraux de maladie tels que la fièvre, l'abattement, et l'inappétence (Bondurant, 1999; Sheldon, 2004). De nombreuses causes ont été associées à la métrite postpartum; mais une des causes importantes est la contamination de l'utérus par certaines espèces bactériennes spécifiques pendant et après le vêlage (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006). Parmi ces espèces bactériennes, *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* et différentes bactéries anaérobies gram-négatif telles que *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenicus* et *Bacteroides* spp., sont de loin les plus fréquemment retrouvées dans l'utérus des vaches présentant les signes cliniques de la métrite postpartum (Sheldon and Dobson, 2004; Földi et al., 2006). Certains auteurs ont suggéré que *E. coli* serait la principale cause de la métrite postpartum, en étant responsable de l'initiation de la maladie chez les vaches et qu'il serait fortement associé à la phase aiguë, à la sévérité des lésions et à l'infertilité qui peut s'en suivre (Dohmen et al., 2000; Földi et al., 2006). Cependant, la présence d'*E. coli* dans l'utérus des vaches postpartum n'entraîne pas toujours le développement de la maladie utérine, car seulement 20% des vaches contaminées par la bactérie après le vêlage présenteront des signes cliniques subséquents de métrite postpartum (Bicalho et al., 2010). Il est donc possible que certaines souches d'*E. coli* aient la capacité de causer la métrite postpartum alors

que d'autres ne l'aient pas. Selon Silva et al. (2009), cette possible différence serait due à la variabilité des gènes de virulence des souches d'*E. coli*. Une étude récente a d'ailleurs suggéré que certains gènes de virulence seraient associés avec la métrite postpartum (Bicalho et al., 2010), alors qu'une autre étude (Silva et al., 2009) n'a rapporté aucune association. Ces données controversées soutiennent en partie l'hypothèse que certaines souches d'*E. coli*, à cause des gènes de virulence qu'elles possèdent, auraient une plus grande pathogénicité que d'autres. Par contre, cette hypothèse mérite d'être investiguée de nouveau. Il faut aussi garder en tête qu'une multitude de gènes de virulence, tels que ceux associés à l'acquisition du fer, ceux permettant d'éviter les mécanismes de défense et ceux codant pour la colonisation des muqueuses, n'ont pas encore été investigués jusqu'à présent et qu'ils pourraient jouer un rôle dans le développement de la métrite postpartum.

La prévalence de la métrite postpartum varie considérablement selon les études et les régions géographiques (Azawi, 2008). Les conséquences majeures de cette maladie sont la baisse de la production laitière et une diminution des performances subséquentes en reproduction (Sheldon et al., 2001; LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2002a; Azawi, 2008). Dans une étude américaine, le coût par lactation d'un cas de métrite postpartum variait de 329\$US à 386\$US (Overton and Fetrow, 2008). Pour lutter efficacement contre cette maladie de manière à limiter les pertes économiques, les éleveurs doivent être capables d'identifier rapidement les vaches à risque et anticiper un traitement préventif. Cette situation met en relief la possibilité de détecter, avant l'apparition des signes cliniques, les vaches ayant un risque élevé de développer subséquemment la métrite postpartum. Étant donné que la contamination bactérienne de l'utérus a lieu dès la première semaine après vêlage (Sheldon et al., 2002a; Földi et al., 2006), l'examen bactériologique de l'utérus dans la première semaine postpartum pourrait potentiellement renseigner sur les risques de développement de la métrite postpartum dans les semaines postpartum.

La présente étude se base donc sur l'hypothèse que la présence de certaines espèces bactériennes et certains gènes de virulence spécifiques d'*E. coli* prélevés durant la première semaine postpartum seraient associés à une augmentation de l'incidence subséquente de la métrite postpartum. Une identification précoce de ces espèces bactériennes et des gènes de virulence d'*E. coli* permettrait d'identifier précocement les vaches à risque élevé.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer s'il existe une association entre la présence des espèces bactériennes dans l'utérus des vaches durant la 1^{ère} semaine postpartum et le développement ultérieur de la métrite postpartum. Un 2^{ème} objectif est de déterminer s'il y a une association entre la présence des gènes de virulence d'*E. coli* et le développement de la métrite postpartum. Un 3^{ème} objectif de l'étude est d'évaluer si l'utilisation des résultats d'analyses bactériologiques (bactéries et gènes de virulence d'*E. coli*) pourrait servir à prédire avec précision l'apparition subséquente de la métrite postpartum chez la vache laitière.

REVUE DE LITTÉRATURE

1 Étude épidémiologique et clinique des métrites postpartum

1.1 Définition de la métrite postpartum

La métrite postpartum est une inflammation sévère de toutes les couches de l'utérus : l'endomètre, le myomètre et la séreuse. Elle se caractérise cliniquement par une infection aigue associée à un retard de l'involution utérine, un écoulement vaginal rouge-brun nauséabond, de la fièvre ($T^{\circ} \geq 39,5^{\circ}\text{C}$), un abattement et des effets systémiques tels que la baisse de l'ingestion d'aliments et de la production laitière durant les 20 premiers jours en lactation (Sheldon et al., 2006). La métrite postpartum survient durant les trois premières semaines qui suivent le vêlage et est fréquemment associée à la rétention placentaire.

1.2 Étude épidémiologique de la métrite postpartum

La prévalence de la métrite postpartum chez les vaches laitières varie considérablement selon les études et les régions géographiques (Azawi, 2008). Plusieurs auteurs ont rapporté un diagnostic de la maladie chez 1% à 40% des vaches laitières (LeBlanc et al., 2002; Goshen and Shpigel, 2006; Sheldon et al., 2009). De nombreuses études ont rapporté plusieurs facteurs de risque pouvant favoriser le développement de la métrite postpartum chez les vaches laitières. Ces facteurs peuvent être d'origine extrinsèque ou intrinsèque.

1.2.1 Facteurs de risque extrinsèques

Dans un troupeau, la prévalence de la métrite postpartum peut varier d'une année à l'autre (Andriamanga et al., 1984). Selon Chaffaux et al. (1991), les conditions climatiques rigoureuses et la gestion du troupeau peuvent influencer la prévalence de la métrite postpartum.

a) La saison de vêlage

Dans la littérature, certaines études révèlent un risque d'incidence de la métrite postpartum plus élevé en hiver et automne qu'en été (Gröhn et al., 1990; Harman et al., 1996; Bruun et al., 2002).

b) La gestion du troupeau

De nombreux facteurs de gestion du troupeau ont également fait l'objet d'études pour évaluer leur association avec le développement de la métrite postpartum. Selon Bruun et al.

(2002), les vaches en stabulation (en enclos) auraient un risque élevé d'incidence de la métrite postpartum comparées aux vaches en pâturage. La taille du troupeau, quant à elle, aurait des effets controversés sur la métrite postpartum; l'étude de Bruun (2002) n'a révélé aucune association entre la taille du troupeau et la métrite postpartum, tandis que Kaneene et al. (1995) révèlent une association entre le nombre élevé d'animaux dans le troupeau et l'augmentation de l'incidence de la métrite postpartum aux États Unis. Les autres facteurs tels que la densité des animaux dans un bâtiment, le logement, la qualité du plancher et la supervision du vêlage par l'éleveur ne seraient pas associés avec le développement de la métrite postpartum (Gröhn et al., 1990; Kaneene and Miller, 1995; Bruun et al., 2002).

c) L'alimentation

L'alimentation du troupeau pourrait jouer aussi un rôle sur le développement de la métrite postpartum, mais surtout de manière indirecte en influençant l'état corporel de l'animal. En effet, les vaches trop grasses ou trop maigres sont plus susceptibles au vêlage dystocique et à la métrite postpartum (Steffan, 1987). Selon le même auteur, chez une vache avec un apport alimentaire insuffisant, le risque de développer une métrite postpartum est de 39%, de 21% lors d'apports excessifs et de 15% pour un apport normal. Le rôle de l'alimentation dans les semaines avant vêlage est très important car le véritable facteur responsable de la majorité des cas de cétose associée à une métrite postpartum serait la suralimentation avant vêlage (Markusfeld, 1987).

1.2.2 Facteurs de risque intrinsèques

Selon Sheldon (2004) les facteurs de risque intrinsèques peuvent être classés en 4 catégories à savoir les facteurs impliqués dans les dommages physiques de l'utérus, les facteurs impliqués dans les changements métaboliques, la contamination bactérienne de l'utérus après vêlage et le statut immunitaire de la vache.

a) Les facteurs de risque impliqués dans les dommages physiques de l'utérus

Ces facteurs sont ceux fréquemment associés à la métrite postpartum et regroupent les facteurs qui contribuent à un vêlage difficile tels que les naissances gémellaires, les dystocies, les rétentions placentaires (Dubuc et al., 2010). À ces facteurs, d'autres auteurs ajoutent les interventions des vétérinaires ou des éleveurs lors des mise-bas dystociques (Gregory et al.,

1997), les mortinatalités, les prolapsus utérins et des avortements (Gröhn et al., 1990, Kaneene and Miller, 1995).

b) Les facteurs de risque impliqués dans les changements métaboliques.

Il s'agit des modifications de la teneur de certains métabolites dans le sang. Une baisse de la consommation des aliments dans les semaines qui précèdent le vêlage pourrait entraîner une baisse d'énergie et prédisposer les vaches au développement de la métrite postpartum (Huzzey et al., 2007). Les résultats de Huzzey et al. (2009) supportent ceux de Markusfeld et al. (1987) et de Gröhn et al. (1990) en rapportant une association entre les maladies métaboliques telles que la fièvre vitulaire, la cétose et le déplacement de la caillette, et la métrite postpartum. Le mécanisme exact derrière ces associations n'est pas encore bien connu. Une teneur élevée dans le sang de certains métabolites tels que les acides gras libres, l'acide β -hydrobutyrique et l'haptoglobine dans la première semaine postpartum a également été associée avec une augmentation du risque de développer la métrite postpartum (Huzzey et al., 2009; Dubuc et al., 2010).

c) Contamination bactérienne de l'utérus après vêlage.

De nombreuses espèces bactériennes peuvent être isolées de l'utérus de la quasi-totalité des vaches dans les 10 à 14 premiers jours postpartum (Sheldon and Dobson, 2004). Des espèces telles que *T. pyogenes*, *E. coli* et les bactéries anaérobies gram négatif telles que *F. necrophorum* et *P. melaninogenicus* ont été isolés majoritairement de l'utérus des vaches présentant les signes cliniques de la métrite postpartum (Földi et al., 2006). Leur présence dans l'utérus de vache après le vêlage augmenterait le risque de développement de la métrite postpartum (Földi et al., 2006; Werner et al., 2012).

d) Le statut immunitaire de la vache.

Le statut immunitaire de la vache et précisément les mécanismes de défense de l'utérus ont pour rôle de protéger l'utérus contre l'invasion bactérienne. Chez la vache, la défense de l'utérus contre l'invasion bactérienne est assurée par des structures anatomiques telles que la vulve, le vestibule et le col de l'utérus, et par des mécanismes physiologiques à savoir la sécrétion de mucus par le vagin et le col de l'utérus (Bondurant, 1999) et la libération des cellules phagocytaires (neutrophile) qui vont migrer dans l'utérus et phagocyter les pathogènes ayant traversés les barrières anatomiques et physiologiques (Azawi, 2008). Chez les vaches dont les mécanismes de migration et de phagocytose des neutrophiles sont défectueux, les

bactéries colonisent rapidement et persistent dans l'utérus, ce qui les rendrait plus vulnérable à la métrite postpartum, comparées aux vaches chez lesquelles la migration des neutrophiles et la phagocytose se font rapidement et parfaitement. Ainsi, la rapidité de migration des neutrophiles dans l'utérus et le bon fonctionnement du mécanisme de la phagocytose détermine la capacité de la vache à lutter contre la métrite postpartum (Gregory et al., 1997).

1.3 Étude clinique de la métrite postpartum

Une des grandes difficultés liées à l'interprétation des données de la littérature sur la métrite postpartum est le manque d'uniformisation de la définition de la condition. Devant ce problème, Sheldon et al. (2006) avait proposé que la métrite postpartum soit définie comme l'affection d'une vache qui présente les signes suivants:

- i) un utérus de taille anormale,
- ii) des écoulements utérins séreux et nauséabonds,
- iii) des symptômes systémiques et une température rectale supérieure à 39,5°C avant 21 jours postpartum.

Cette proposition avait pour but de standardiser la définition de la métrite postpartum entre les études et de permettre de comparer les études entre elles. Malgré que cette définition standardisée soit utilisée couramment depuis quelques années, il est parfois difficile de comparer les études réalisées avant 2006 à cause de la variabilité de la définition de la maladie.

1.4 Les méthodes de diagnostic de la métrite postpartum.

Le diagnostic de la métrite postpartum chez les vaches laitières est complexe; plusieurs méthodes peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Le choix d'une méthode repose sur 3 principaux facteurs : la rapidité de réalisation, la difficulté d'exécution et l'exactitude des résultats. La rapidité de réalisation d'une méthode et de la livraison des résultats est très importante car, plus le diagnostic est rapide et précoce, plus l'identification des vaches à haut risque pourrait être faite rapidement. La difficulté d'exécution doit être prise en compte dans le choix d'une méthode car elle peut influencer les résultats. Quant à l'exactitude de la méthode (sensibilité et spécificité), il conditionne la fiabilité du diagnostic.

1.4.1 L'examen de l'état général de l'animal

L'examen de l'état général comprend, entre autre, la prise de la température rectale, l'examen des muqueuses, l'évaluation du comportement et de l'attitude, de l'appétit et de la condition corporelle de l'animal (Benzaquen et al., 2007). Une température $> 39,5^{\circ}\text{C}$ associée à une perte d'appétit et à une baisse de la production laitière dans les 3 premières semaines postpartum sont des signes de suspicion de la métrite postpartum (Földi et al., 2006).

1.4.2 La palpation transrectale de l'utérus

La palpation permet, entre autre, d'évaluer le volume, la consistance et le diamètre des cornes utérines (Studer et al., 1978). Elle permet de suspecter un utérus dont les cornes sont plus larges et/ou plus longues que la normale, une consistance anormale et la présence de sécrétions qui traduirait une infection (Gregory et al., 1997). Cependant, la faiblesse de cette méthode réside dans le fait que l'involution utérine ne se produit pas au même rythme chez toutes les vaches (Vaillancourt, 1987). Alors, la détermination précise d'une anomalie de taille ou de consistance des cornes utérines n'est pas facile à réaliser et n'est pas objective. De plus, le résultat de cette technique dépend de l'expérience et de la compétence de l'opérateur (Gregory et al., 1997). Selon Földi et al. (2006) et Sheldon et al. (2006), la palpation transrectale n'est pas suffisante pour diagnostiquer la métrite postpartum car elle manque d'exactitude (sensibilité et une spécificité très faibles).

1.4.3 L'examen du contenu vaginal

L'examen du contenu vaginal est basé sur la qualité des sécrétions qui s'écoulent du vagin (Gregory et al., 1997). L'inspection de la queue de l'animal et des traces sur le sol en constitue souvent une première étape. L'analyse de l'écoulement se fait par observation de la couleur et du contenu. L'observation d'un mucus claire, ne contenant pas de débris de la muqueuse traduirait une absence d'infection; mais lorsque le mucus est de couleur rouge ou brun, contenant du pus et/ou des débris de la muqueuse et dégageant une mauvaise odeur, ceci pourrait être relié à la métrite postpartum (Williams et al., 2005).

1.4.4 Les tests bactériologiques

Les tests bactériologiques permettent de confirmer la présence ou l'absence des germes dans l'utérus. Les prélèvements se font par biopsie de l'utérus ou avec un écouvillon utérin. Le

résultat est basé sur la présence ou l'absence des espèces bactériennes généralement associées à la métrite postpartum, à savoir *Trueperella. pyogenes*, *Fusobacterium. necrophorum*, *Prevotella. melaninogenicus* et *Escherichia. coli* (Dohmen et al., 2000; Földi et al., 2006). Mais la présence de ces bactéries dans l'utérus d'une vache ne signifie pas automatiquement que l'animal souffre de la métrite postpartum (Földi et al., 2009). En général, les tests bactériologiques sont non seulement rarement effectués, mais ils sont faits après l'observation des signes cliniques de la métrite postpartum, dans le but de confirmer la présence d'une infection bactérienne, de donner un pronostic, de connaître les espèces bactériennes en cause et de savoir quels antibiotiques administrer. Cependant, de plus en plus, les études révèlent que la contamination de l'utérus par *E. coli* s'effectue dès les premiers jours postpartum, et que la présence de cette bactérie favoriserait la croissance des autres espèces bactériennes telles que *T. pyogenes* et *F. necrophorum* dans la lumière utérine (Dohmen et al., 2000). Des études ont également révélé une association entre la présence intra-utérine d'*E. coli* et *T. pyogenes* dans les premiers jours postpartum et le développement subséquent de la métrite postpartum (Werner et al., 2012). De plus, la présence de certains gènes de virulence dans les *E. coli* a également été associée au développement subséquent de la métrite postpartum (Bicalho et al., 2010). Ces résultats laissent penser que si les tests bactériologiques sont effectués plus tôt, dès la première semaine postpartum, ils pourraient être utilisés, non pas pour confirmer la métrite postpartum, mais pour prédire les risques de développement de la métrite postpartum chez les vaches laitières. Ainsi, si les tests bactériologiques sont effectués dans la première semaine postpartum, avant l'apparition des signes cliniques, ils pourraient offrir la possibilité d'identifier les vaches à risque élevé de développer la métrite postpartum et d'anticiper un traitement préventif qui aura comme avantage une réduction des pertes en lait et en reproduction dans le troupeau laitiers.

1.5 Pathogénie de la métrite postpartum

Les espèces bactériennes les plus fréquemment isolées dans les cas de métrite postpartum sont *T. pyogenes*, *F. necrophorum*, *P. melaninogenicus* et *E. coli* (Dohmen et al., 2000; Földi et al., 2006). Le rôle de chacune de ces espèces bactériennes dans la pathogénie de la métrite postpartum n'est pas encore bien élucidé. Néanmoins, certains auteurs tels que Dohmen et al. (2000) et Bicalho et al. (2012) suggèrent que *E. coli* serait la première espèce

bactérienne à coloniser l'utérus après le vêlage et ainsi, serait la bactérie la plus fréquemment isolée (30 à 50 % des vaches) dans l'utérus de vaches lors des jours qui suivent le vêlage. *Escherichia coli* produit de nombreuses toxines qui induisent des lésions de la muqueuse utérine; ces lésions seraient des sites de multiplication rapide des autres espèces bactériennes opportunistes telles que *T. pyogenes*, *F. necrophorum* et *P. melaninogenicus* dans la lumière utérine (Dohmen et al., 2000). *Fusobacterium necrophorum* produit une leukotoxine, *P. melaninogenicus* produit une substance qui préviendrait la phagocytose, et *T. pyogenes* produit un facteur de croissance pour *F. necrophorum* (Gregory et al., 1997). La multiplication de ces espèces bactériennes stimule le système immunitaire de la vache qui réagit par une migration massive des cellules phagocytaires dans l'utérus (Azawi, 2000). Le développement de la métrite postpartum dépendrait des espèces bactériennes présentes dans l'utérus, de la charge bactérienne et de la capacité des cellules phagocytaires à éliminer les bactéries (Sheldon, 2004). Ainsi, lorsque les cellules phagocytaires de l'utérus ne parviennent pas à éliminer les bactéries, celles-ci persistent dans l'utérus et agissent en synergie pour déclencher une réaction inflammatoire qui se traduira par l'expression des signes cliniques de la métrite postpartum.

Bicalho et al. (2012) ont confirmé cet effet synergique en révélant que la présence simultanée des gènes de virulence *lktA* de *F. necrophorum* et *fimH* d'*E. coli* a été associée à la métrite postpartum. Dans une étude réalisée sur 375 vaches laitières et 32 gènes de virulence, le même auteur a rapporté que les gènes de virulence *fimH*, *kpsMTII*, *astA*, *hlyA*, *cdt*, et *ibeA* d'*E. coli* sont associés à la métrite postpartum (Bicalho et al., 2010), alors que dans une étude similaire, Silva et al. (2009) n'avaient pas trouvé d'association entre les gènes de virulence d'*E. coli* et la métrite postpartum. L'absence d'association dans l'étude de Silva pourrait être due à un manque de puissance des analyses statistiques due à une taille d'échantillon très réduite (n = 30) et à un nombre réduit des gènes testés (n = 15). D'autre part, la présence d'association dans certaines études et pas d'autres pourrait suggérer l'existence de plusieurs souches d'*E. coli*, dont certaines seraient pathogènes et d'autres non-pathogènes dans l'utérus. Il est possible que *E. coli*, étant la première espèce bactérienne à coloniser l'utérus, ait une influence non négligeable sur le développement de la métrite postpartum selon qu'il s'agisse d'une souche pathogène ou non-pathogène.

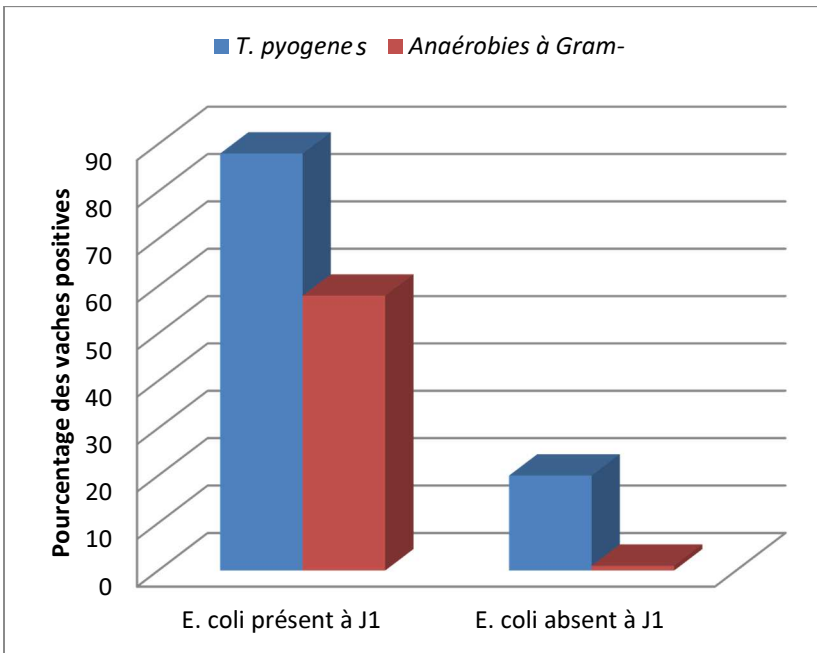


Figure 1: Relation entre la prévalence de *E. coli* à 1 jour postpartum et la prévalence d'autres bactéries à 14 Jours postpartum

Source: Adapté de Dohmen et al., 2000

2 *Escherichia coli*, une espèce bactérienne polymorphe

L'espèce bactérienne *E. coli* a été identifiée pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle par le médecin Allemand Théodor Escherich. Lors de ses travaux, il réussit à isoler 19 souches bactériennes, des bacilles et des coques, à partir du colon du nouveau-né. En suivant les méthodes de culture anaérobie, Escherich décrit en détail une souche bactérienne à laquelle il donna le nom de *Bacterium coli commune*, aujourd'hui connue sous le nom de *Escherichia coli* (Shulman et al., 2007).

Escherichia coli est parmi les espèces bactériennes les plus connues et les plus étudiées de nos jours. Il s'agit d'un bacille Gram-négatif non sporulant qui colonise le tractus intestinal des mammifères dès les premières 24h après la naissance. Cette bactérie est généralement retrouvée dans le mucus sécrété par les cellules épithéliales du colon, mais aussi dans le sol. Il s'agit de la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le colon des humains, des animaux et des oiseaux (Freter et al., 1983; Kaper, 2005). Il existe donc de nombreuses

souches commensales d'*E. coli* qui sont très bien adaptées à une cohabitation pacifique avec l'hôte; raison pour laquelle des études ont été faites sur l'utilisation d'un mélange de souches commensales comme probiotique dans le traitement des maladies telles que les diarrhées infectieuses et les ulcères du colon (Kaper, 2005). *Escherichia. coli* est aussi utilisée comme marqueur de la qualité de l'eau et des aliments, particulièrement comme indicateur de contamination fécale. Cette bactérie est également utilisée comme un outil de travail dans la recherche scientifique, dans des études de génétique, de biologie moléculaire, de physiologie, et de biochimie (Kaper, 2005).

Cependant, c'est le caractère pathogène d'*E. coli* qui a le plus attiré l'attention des scientifiques. Le Dr. Escherich lui même avait déjà émis des soupçons que la bactérie *B. colicomune*, qu'il décrivait comme une bactérie de la flore intestinale normale de tout individu sain, pourrait aussi provoquer des infections non seulement de l'intestin mais aussi d'autres systèmes tel que les systèmes urinaire, nerveux ou sanguin, et même la mort (Kaper, 2005; Shulman et al., 2007). Ses soupçons se sont confirmés plus tard par d'autres études qui ont révélé que *E. coli* est responsable de la mort de millions de personnes et d'animaux par an, que ce soit par infections intestinales ou extra-intestinales (Russo and Johnson, 2003; Touchon et al., 2009). Cette capacité de *E. coli* à cohabiter de manière pacifique avec l'hôte d'une part, et à provoquer des maladies et même la mort de l'hôte d'autre part, témoigne de la grande diversité des souches qui existent chez cette espèce. De nombreuses méthodes de classification ont été développées pour regrouper ces souches en fonction de leur affinité antigénique, de leur évolution, ou de leur degré de parenté.

2.1 Méthodes de classification des souches d'*E. coli*

La classification des souches d'*E. coli* est importante non seulement pour faire la distinction entre les souches pathogènes et les souches non pathogènes, mais aussi pour faire des investigations épidémiologiques en identifiant les souches responsables des épidémies et les sources de contamination (Gyles et al., 2010). Ainsi, plusieurs auteurs ont proposé différentes méthodes de classification.

2.1.1 Classification par sérotype

La première classification de l'espèce *E. coli* a été proposée par Orskov et al. (1976), basée sur la distribution non aléatoire des antigènes de surface présents sur la bactérie. Cette

méthode, appelée sérotypage, consiste à déterminer, par agglutination, les antigènes structuraux de la bactérie et distingue 2 types d'antigènes sur *E. coli*; l'antigène "O" du lipopolysaccharide (LPS) qui détermine le sérotype, et l'antigène "H" du flagelle. La combinaison des antigènes O et H détermine le sérotype. Par exemple les souches nommées O111: H4 et O111: H12 appartiennent au même sérotype "O111" mais à des sérotypes différents "O111 : H4" et "O111: H12". Cette classification a pu distinguer 160 antigènes "O" et 53 antigènes "H". Très peu de laboratoires effectuent le sérotypage complet d'*E. coli*; la plus part se limitent à la détermination du sérotype déterminé par l'antigène "O". C'est ainsi que certains sérotypes ont été associés à certaines infections chez des espèces animales. Par exemple, les sérotypes O5, O26, O111 et O118 sont reconnus impliqués dans les maladies entériques chez les bovins (Gyles et al., 2010). Tandis que le sérotype O78 est associé à de nombreuses infections chez la volaille (Mellata et al., 2003), Les souches du sérotype O157 : H7 sont à l'origine de nombreux cas de gastroentérite chez l'humain. Le désavantage de cette classification est que certaines souches sont non-typables et par conséquent n'appartiennent à aucun sérotype déjà connu. Contrairement à la sérotypie qui est une méthode de classification des souches en fonction des antigènes de surface, les méthodes qui suivent ont été développées pour classer les souches d'*E. coli* en fonction de la relation clonale qui existe entre elles.

2.1.2 Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Plus tard dans les années 1980, la classification ECOR (*E. coli* Collection Reference) est apparue. En utilisant la méthode Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), Ochman et Sealander (1984) ont pu établir et caractériser une collection de 72 souches d'*E. coli* provenant de différents hôtes et endroits géographiques qui représentaient la variation génotypique de l'espèce totale. La méthode MLEE est basée sur la détermination de la séquence des acides aminés des diverses enzymes produites par la bactérie. Cependant, la faiblesse de cette méthode est qu'une mutation peut altérer la séquence d'ADN d'un gène sans toutefois altérer l'acide aminé qui en découle. Inversement, la séquence d'acides aminés d'un enzyme peut être altérée par les conditions environnementales sans que le gène responsable ne soit modifié. Ceci rend difficile la reproductibilité de la méthode MLEE, qui a été subséquemment remplacée par

la méthode «Multilocus Sequence Typing» (MLST), dans les années 1990s (Foley et al., 2009).

2.1.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

La méthode MLST est une classification phylogénétique qui regroupe les différentes souches en fonction de leur degré de parenté et qui permet de comprendre leur évolution. Cette méthode est basée sur la détermination des séquences nucléotidiques de plusieurs gènes de ménage. Les gènes de ménage sont présents dans tous les isolats d'une espèce et ont une variabilité suffisante pour former les allèles différents pour chaque souche. Les allèles de chacun des gènes séquencés sont regroupés ensemble et la souche se voit attribuer un "type de séquence" spécifique, communément appelé "Sequence-Type" (ST). Les isolats qui ont des "ST" identiques sont définis comme étant un même clone par MLST. L'un des avantages de la méthode MLST est qu'il existe une base de données universelle (www.mlst.net) dans laquelle se trouvent tous les "Sequence-Type" d'*E. coli* déjà identifiés. En 2012 cette base de données contenait 4245 isolats d'*E. coli* appartenant à 2545 ST d'*E. coli*. Les résultats de MLST de divers laboratoires partout au monde sont envoyés dans cette base de données pour comparer et identifier le ST. Si un ST ne se trouve pas dans cette base de données, un nouveau nom lui est attribué (Foley et al., 2009). De nombreux auteurs ont déjà utilisé la méthode MLST pour caractériser les souches d'*E. coli*. Ainsi, Wu et al. (2012) révèlent que les *E. coli* provenant des animaux en Angleterre appartiennent aux Sequence-Types: ST23, ST155 et ST117.

2.1.4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Cette méthode est le résultat de la combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure et d'une électrophorèse adaptée à la grande taille des produits de digestion. Le résultat est un profil de restriction intéressant tout le génome du microorganisme et définit ce qu'on appelle un "Pulsetype". L'intérêt majeur de cette technique réside dans le fait qu'elle permet d'étudier l'ensemble du génome (les gènes de ménage et les gènes de virulence) et présente donc un pouvoir discriminant potentiellement plus important que la méthode MLST. Cependant, la méthode PFGE est moins utile pour étudier l'évolution des souches et demande un certain degré d'expertise et sa mise au point peut s'avérer longue. Elle est plus souvent employée pour la comparaison des souches au sein d'un laboratoire, compte tenu, parfois, de la faible reproductibilité inter laboratoires des résultats (Foley et al.,

2009). La méthode PFGE est capable de distinguer plus de souches d'*E. coli* que la méthode MLST car dans une étude, Foley et al. (2004) avaient typé 92 isolats d'*E. coli* O157:H7 d'origine bovine en utilisant ces 2 méthodes. La méthode PFGE a révélé 72 profils "pulsotypes" différents alors que la méthode MLST a révélé seulement 5 profils "Sequence-Type" différents.

2.1.5 Classification par groupes phylogénétiques

En utilisant la technique PCR, une nouvelle classification de la bactérie *E. coli* a vu le jour dans les années 2000. Il s'agit d'une autre classification phylogénétique qui regroupe les différentes souches en fonction de leur degré de parenté et qui permet de comprendre leur évolution. Ainsi les souches ayant un ancêtre commun sont dans un même groupe. Cette nouvelle approche avait permis de répartir les souches d'*E. coli* en 4 groupes phylogénétiques nommés A, B1, B2 et D; (Clermont et al., 2000; Jaureguy et al., 2008), en utilisant une méthode PCR Triplex, basée sur la présence et l'absence des gènes *chuA*, *yjaA* et du fragment d'ADN TSPE4C2. Cette nouvelle classification a été récemment améliorée par Clermont et al., (2013), en ajoutant le gène *arpA*, ce qui permet désormais de classer les *E. coli* en 8 groupes phylogénétiques nommés A, B1, B2, C, D, E et F (Figure 2) en utilisant une méthode PCR Quadruplex. Selon cette classification, le groupe B2 est le plus ancien phylogénétiquement, et les groupes A et B1 sont très proches et plus récents (Herzer et al., 1990; Clermont et al., 2000; Jaureguy et al., 2008). Le groupe E représente un petit nombre de souches qui n'étaient pas classifiable par la méthode PCR Triplex, parmi lesquelles la célèbre souche O157 : H7. Le groupe F est à présent bien défini et représente les souches très proches du groupe B2 et le groupe C représente les souches très proches du groupe B1. Un dernier groupe appelé: "*Escherichia clade1*", qui pourrait être une nouvelle espèce, est génétiquement différent, mais phénotypiquement non distinguable d'*E. coli* (Clermont et al., 2013).

Chez l'humain, les souches d'*E. coli* pathogènes responsables des infections extra-intestinales appartiennent principalement au groupe B2, et minoritairement au groupe D, mais à aucun autre groupe; tandis que la plus part des souches commensales appartiennent au groupe A (Herzer et al., 1990; Clermont et al., 2000; Jaureguy et al., 2008). Chez les animaux, par contre, le groupe dominant chez les ExPEC est le B1 (41%), suivi du groupe A (22%) et B2 (21%), puis D (16%; Clermont et al., 2008). Dans une étude conduite par Wu et al. (2012)

chez différentes espèces animales, la majorité des souches ExPEC appartenait aux groupes B1 et A.

De nombreuses autres méthodes de classification sont utilisées pour distinguer les souches d'*E. coli*; on peut citer: La "Restriction fragment length polymorphism" (RFLP), "Amplified fragment length polymorphisms" (AFLP), "Variable number of tandem repeat" (VNTR), "Amplification Profiling by PCR", "Random amplified polymorphic DNA PCR" (RAPD-PCR) (Foley et al., 2009). La méthode RAPD-PCR a déjà été utilisée par Bicalho (2010) pour différencier les isolats d'*E. coli* provenant des cas de métrites chez la vache postpartum. Le choix d'une méthode dépend du degré de discrimination, la capacité de facilement tester un grand nombre de souches, et des coûts.

La clonalité des *E. coli* s'avère donc assez complexe; la classification phylogénétique révèle des groupes à large spectre qui ne sont pas spécifiques à une infection précise tandis que la classification par sérotype révèle des clones très spécifiques à certaines infections. Certains sérotypes sont également spécifiques à un seul groupe phylogénétique; par exemple la souche O157: H7 responsable de la diarrhée chez l'humain se trouve uniquement dans le groupe phylogénétique "E" (Clermont et al., 2008). Dans un groupe phylogénétique, on retrouve plusieurs sérogroupes et dans un même séro groupe on retrouve plusieurs "pulsetypes" de la méthode PFGE et plusieurs "Sequence-Type" de la méthode MLST.

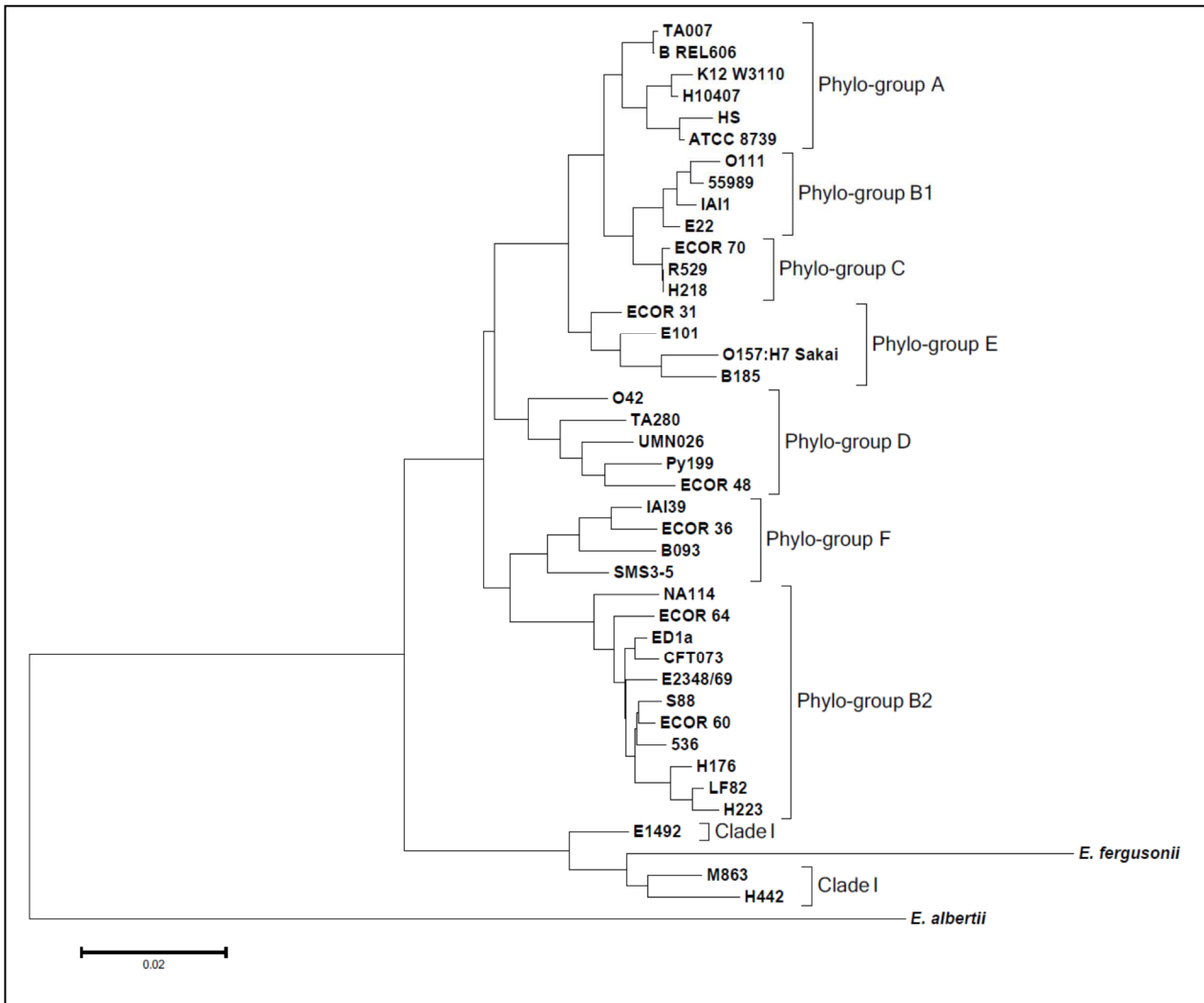


Figure 2. Diversité phylogénétique des *E. coli*

Source: Adapté de Clermont et al., 2013.

2.2 Diversité génétique d'*Escherichia. coli*

Le génome d'*E. coli* est constitué de 2 principales bases génétiques: une base génétique commune appelé "core genome" présente chez toutes les souches d'*E. coli* et qui les regroupe dans une même espèce; il s'agit des "gènes de ménage", et une base génétique dérivée, qui est très différente entre les souches. Cette base génétique dérivée est à l'origine de la grande variabilité génétique et de l'expression des gènes de virulence qu'on retrouve chez *E. coli* (Hendrickson, 2009). Le répertoire total des gènes de *E. coli* est estimé à ce jour à 17838 gènes, parmi lesquels 4721 gènes appartiennent à la majorité des souches et seulement 1976 gènes (11%) appartiennent à la base génétique commune à toutes les souches (Touchon et al., 2009; Figure 3). L'analyse des séquences génomiques connues montre que le nombre de gènes communs à toutes les souches n'augmente pas, tandis que le nombre de gènes spécifiques à chaque souche, qui sont pour la plus part des gènes de virulence, ne cesse d'augmenter (Tenaillon et al., 2010).

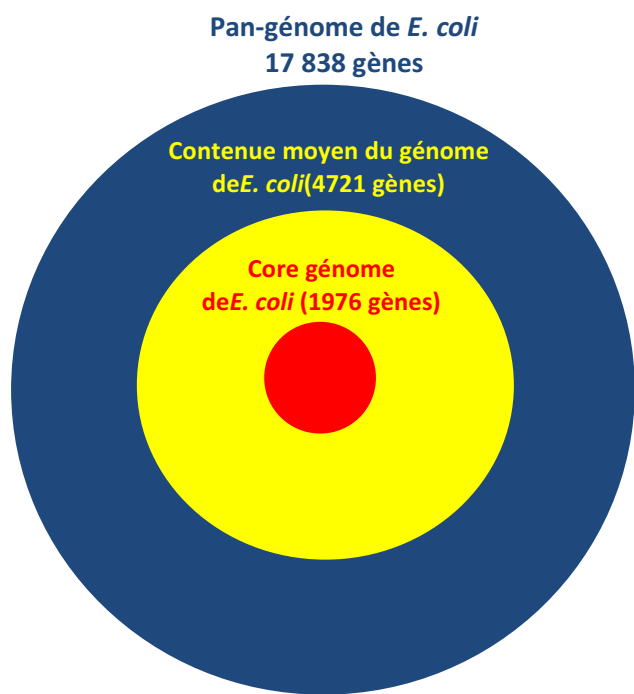


Figure 3. La plasticité génomique des *E. coli*.

En bleu la totalité des gènes connus dans l'espèce (« pan-genome »), en jaune le contenu moyen en nombre de gènes chez une souche d'*E. coli* donnée et en rouge le nombre de gènes communs (fond commun), ou « coregenome » à toutes les souches

Source: Adapté de Hendrickson, 2009

Ce grand nombre de gènes justifie l'existence de nombreuses souches dont certaines sont commensales et d'autres pathogènes. De plus, parmi les souches pathogènes il existe plusieurs groupes appelés "pathotypes", qui se distinguent les uns des autres par leurs facteurs de virulence et leur pathogénicité.

2.3 Les *Escherichia. coli* pathogènes

La plupart des souches d'*E. coli* sont commensales, seule une petite proportion des souches étant pathogènes. Les souches pathogènes sont classées en plusieurs groupes appelés pathotype, en fonction de leurs facteurs de virulence, des environnements colonisés, des caractéristiques d'invasion et de la pathologie induite. Les souches appartenant à chaque pathotype possèdent des gènes de virulence dont certains sont spécifiques et d'autres communs à plusieurs pathotypes (Tableau I). En fonction de l'environnement colonisé, on distingue les pathotypes adaptés à l'environnement intra-intestinal et des pathotypes adaptés à l'environnement extra-intestinal.

Tableau I: Potentiels gènes de virulence des *E. coli*

Catégorie	Gène	Description	Références
Adhésines	FimH	Adhésine spécifique au D-mannose, fimbriae de type 1	Mobley et al., 1987; Sokurenko et al., 1995
	PapC	Pilus associated with pyelonephritis (P fimbriae)	Arthur et al., 1989b; O'Hanley et al., 1985
	Sfa	S fimbriae (sialic acid-specific)	Johnson et al., 2002c
	bmaE	Blood group M-specific adhesin	Chapman et al., 2006
	Afa,	Central region of Dr antigen-specific fimbrial and afimbrial adhesin operons	Nowicki et al., 1989; Zhang et al., 1997
	Aida	Adhesin involved in diffuse adherence, consisting of AIDA-I (<i>orfB</i>) and, AIDAc (<i>orfBc</i>)	Chapman et al,2006
	Eae	Intimin	Chapman et al.,2006
	Paa	Porcine A/E-associated gene	Chapman et al.,2006
	ibeA	Invasion of brain endothelium	Johnson et al., 2002c
	F17	Fimbrial adhesin protein	Cid., 1999
Toxins	F5	Fimbrial adhesin protein	Ojeniyi., 1994
	Cdtb	Cytolethal distending toxin	Johnson et al., 2002c
	Cnf1	Cytotoxic necrotizing factor 1	Khan et al., 2002
	Cnf2	Cytotoxic necrotizing factor 1	Oswald., 1994
	cvaC	Colicin V, conjugative plasmids (<i>traT</i> , <i>iss</i> , and antimicrobial resistance)	Fernandez-Beros et al., 1990
	East-1	EaggEC heat-stable enterotoxin	Chapman et al.,2006
	hlyA	α -Hemolysin	O'Hanley et al., 1991; Welch et al., 1981
	hlyE		Silva et al., 2009
	LT	Heat-labile toxin	Chapman et al.,2006

	Sta	Heat-stable enterotoxin a	Chapman et al., 2006
	Stb	Heat-stable enterotoxin b	Chapman et al., 2006
	Stx1	Shiga toxin I	Chapman et al., 2006
	Stx2	Shiga toxin II	Chapman et al., 2006
	Tsh	temperature-sensitive hemagglutinin	Dozois et al., 2003; Heimer et al., 2004
Sidérophores	fyuA	<i>Yersinia</i> siderophore receptor (ferric yersiniabactin uptake)	Chapman et al., 2006
	sitA	Periplasmic chelator iron-binding protein	Chapman et al., 2006
	iutA	Ferric aerobactin receptor precursor	Clermont et al., 2001; Fernandez-Beros et al., 1990
	iucD	Ferric aerobactin synthesis (iron uptake/transport)	Clermont et al., 2001; Fernandez-Beros et al., 1990
	FepC	iron-enterobactin transporter subunit	Ye et al., 2001
	IroN	iron-related siderophore receptor	Negre et al., 2004; Russo et al., 2002
	Irp1, irp2	Iron regulatory protein	Clermont et al., 2001; Schubert et al., 1998
Capsulaires	kpsM TII	Group II capsular polysaccharide synthesis (e.g., K1, K5, and K12)	Johnson and Stell., 2000
	Iss	Increased Serum Survivalgene	Delicato et al., 2003
Autres gènes	malX,	Pathogenicity-associate	Li et al., 2005; Johnson et al., 2001a, 2003b
	usp,	Uropathogenic-specific protein (bacteriocin)	Yamamoto et al., 2001
	hra1,	Non fimbrial hemagglutinine	Ewers et al., 2007
	neuC,		Ewers et al., 2007
	cs31a		Girardeau, 1991

Source: Adapté de Chapman et al., 2006

2.3.1 Les *E. coli* pathogènes du tractus intestinal

Il s'agit des souches qui colonisent et séjournent dans le tractus intestinal, on distingue:

a) Les *E. coli* entérotoxigènes appelé ETEC

Les principaux facteurs de virulence des ETEC sont des adhésines et des toxines. Ces souches se localisent dans le jéjunum et l'iléon où ils adhèrent aux microvillosités et produisent des toxines qui stimulent une sécrétion excessive de liquide dans la lumière intestinale entraînant la diarrhée chez plusieurs espèces, surtout le porc (Noamani et al., 2003), le bovin et l'humain. Ces toxines sont classées en 2 groupes; les toxines stables à la chaleur (STa et STb) et les toxines instables à la chaleur (LT; Kaper et al., 2004).

b) Les *E. coli* producteurs de toxine shiga appelé STEC

Les souches de ce pathotype résident majoritairement dans le jéjunum et l'iléon et produisent des toxines shiga (Stx) aussi appelées vérotoxine (VT). Les 2 principales toxines produites sont Stx1 et Stx2 (VT1 et VT2) qui constituent les principaux facteurs de virulence des STEC. Ces toxines traversent la paroi intestinale et causent des dommages dans les vaisseaux sanguins, provoquant de l'œdème dans différents tissus. Les STEC sont responsables des colites hémorragiques et le syndrome urémique-hémorragique chez l'humain et la maladie de l'œdème chez le porc. Certaines des souches STEC, en plus de produire les toxines Stx possèdent aussi l'îlot génomique de pathogénicité "Locus of enterocytes effacement" (LEE) et produisent des lésions d'attachement et d'effacement (AE); ces souches sont appelées *E. coli* Entérohémorragique (EHEC; Kaper et al., 2004).

c) Les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC)

Les souches de ce pathotype produisent des lésions d'attachement et d'effacement (AE) mais ne produisent pas de toxine shiga (Stx). Ces souches se localisent majoritairement dans l'intestin et produisent leur propre récepteur qu'elles injectent dans la cellule épithéliale puis une adhésine bactérienne, appelée "intimine", soude intimement la bactérie et les récepteurs de la cellule. Une fois solidement attachée à la paroi intestinale, la bactérie détruit les microvillosités de la muqueuse intestinale. Les EPEC sont responsables de gastroentérites chez les enfants et les jeunes animaux, précisément chez le veau et le porcelet (Fairbrother, 1993; Kaper et al., 2004).

2.3.2 Les *E. coli* pathogènes extra intestinal (ExPEC)

Les souches ExPEC sont de nature opportuniste et résident dans l'intestin des animaux sains sans toutefois causer de maladies. Contrairement aux souches pathogènes du tractus intestinal, les souches ExPEC se caractérisent par leur capacité à coloniser, subsister et causer des dommages dans d'autres organes en dehors du tractus intestinal (Russo and Johnson, 2000). Cette catégorie comprend les souches d'*E. coli* impliquées dans un large spectre d'infections, y compris les septicémies et les infections du système nerveux, des voies urinaires, des glandes mammaires et des voies génitales. Ainsi, les ExPEC sont encore subdivisés en sous-pathotype en fonction des organes dans lesquelles ils causent des infections (Gyles and Fairbrother, 2010).

Les souches **ExPEC** impliquées dans les septicémies sont regroupées dans le sous-pathotype: "Septicemic Pathogenic *E. coli*" (SEPEC). Les SEPEC ont la capacité de persister et de se multiplier massivement dans le sang et de nombreux organes, entraînant une infection générale aiguë pouvant aboutir à un choc et à la mort de l'animal (Gyles, 2011). Les *E. coli* septicémiques ont déjà été isolés des cas de septicémie chez plusieurs espèces animales, particulièrement chez les jeunes animaux tels que les porcelets nouveau-né et parfois les porcelets sevrés (Fairbrother et al., 1994) et le veau. (Gyles, 2010). Chez le poulet, les SEPEC sont inclus dans le sous pathotype "Avian pathogenic *E. coli* " (APEC) qui regroupe toutes les souches d'*E. coli* responsables des infections chez la volaille. Chez cette espèce, les APEC ont été associés à des infections du système respiratoire, la cellulose et la colibacillose aviaire (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999) et la salpingite chez quelle espèce (Mellata, 2013).

Certaines souches ExPEC sont responsables des infections du tractus urinaire (cystites et pyélonéphrites); ils sont appelés «Uropathogenic *E. coli* (UPEC)». Ces souches sont plus fréquemment isolées chez l'humain, les chiens et les chats chez lesquelles elles sont responsables de cystites et pyélonéphrites (Gyles et al., 2011).

Un autre sous-pathotype des ExPEC est celui des *E. coli* méningitiques (MNEC). Les souches de ce sous-groupe sont les principales causes des méningites du nouveau-né chez l'humain avec une mortalité pouvant atteindre 40% et des risques élevés de séquelles neurologiques (Dawson et al., 1999).

2.4 Pathogénie des infections par les ExPEC

Les souches ExPEC qui contaminent l'environnement sont ingérées par les animaux susceptibles et entrent dans le tractus intestinal (Gyles and Fairbrother, 2010). À l'aide des adhésines, les ExPEC colonisent la muqueuse intestinale. Lorsque survient un déséquilibre de la microflore intestinale ou une faiblesse du système immunitaire, les souches ExPEC se multiplient rapidement, traversent la muqueuse intestinale et atteignent la matrice extracellulaire ou la circulation sanguine et envahissent d'autres organes. Ces bactéries ont la capacité de résister aux effets létaux du complément et des phagocytes, et ainsi persister et se multiplier dans le système, et ce, en partie dû à la production des sidérophores tels que l'aérobactine. La bactérie peut ensuite produire des toxines qui endommagent les tissus. La libération d'endotoxines par la bactérie morte peut déclencher des réponses cytokinaires pouvant entraîner un choc et la mort de l'animal (Figure 4). Cette pathogénie particulière des ExPEC est due à la présence d'une grande variété de facteurs de virulence chez les souches appartenant à ce sous-groupe (www.ecl-lab.ca).

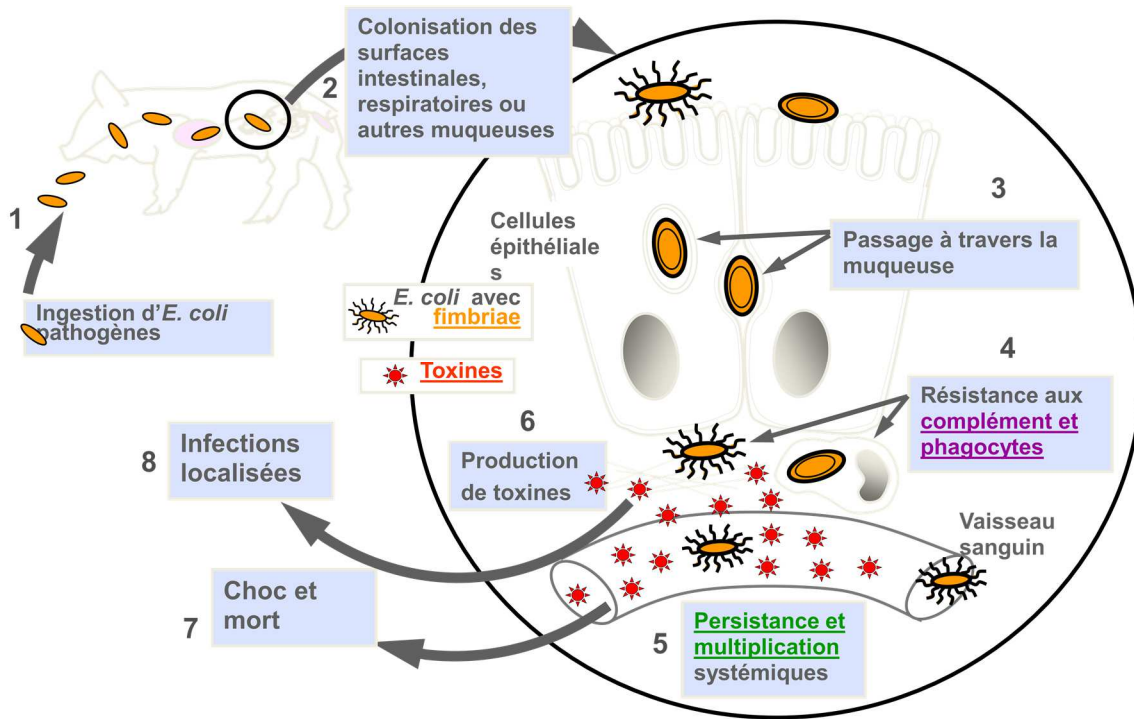


Figure 4: Pathogénie des infections des ExPEC

Source: <http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>

Avec l'autorisation de Dr. J.M. Fairbrother

2.5 Les facteurs de virulence des ExPEC et les gènes associés

Les ExPEC portent différents facteurs de virulence qui leur permettent de s'adapter à la vie extra-intestinale et leur conférer la pathogénicité. Ces facteurs sont codés par certains gènes de virulence dont la grande variabilité est l'une des caractéristiques des souches ExPEC (Tableau I). En fait, il n'existe pas de gènes qui caractérisent les ExPEC comme les autres pathotypes; par contre il est considéré que plus le nombre de gène de virulence est élevé, plus il y'a des chances que la souche soit virulente. Parmi les gènes de virulence déjà observés chez les ExPEC, on retrouve ceux qui codent pour les systèmes de captation et d'acquisition du fer, les adhésines, les protéines membranaires et les toxines (Johnson and Russo, 2002).

2.5.1 Les principaux systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un cofacteur enzymatique qui entre dans la structure des transporteurs d'électrons comme les cytochromes et les protéines fer-soufre, et il est aussi un régulateur global de nombreux systèmes métaboliques aussi bien chez les mammifères que chez les bactéries (Sprenzel et al., 2000). Par contre, chez les animaux, le fer est généralement lié aux protéines, ce qui limite sa disponibilité pour les bactéries. Pour pallier à cette faible disponibilité, certaines bactéries et en particulier les ExPEC expriment à leur surface des récepteurs de molécules riches en fer comme l'hème, hémoglobine, lactoferrine et utilisent plusieurs systèmes de capture de fer connus sous le nom de sidérophore (Mietzner and Morse, 1994). Les sidérophores fréquemment rencontrés chez les souches ExPEC sont l'aérobactine, l'entérobactine, la salmocheline, la yersiniabactine et différents systèmes de transport du fer.

L'aérobactine est régulé par les gènes *iucABCD* (*iuc*; Iron- Uptake Chelate) qui codent pour sa synthèse et le gène *iut* (Iron-Uptake Transport) qui code pour un récepteur membranaire de l'aérobactine (Williams and Carbonetti, 1986). Les gènes *iut* et *iucD* ont, déjà été retrouvés chez les APEC (Dziva and Stevens, 2008), les UPEC (Wiles et al., 2008b) et les *E. coli* du système urinaire chez l'humain (Carbonetti et al., 1986). Contrairement au gène *iut*, le gène *iucD* a déjà été identifié chez les souches ExPEC isolées de l'utérus de vaches en période postpartum, mais son association avec la métrite postpartum n'a pas encore été démontré (Silva et al., 2009).

L'entérobactine facilite l'entrée du fer dans le cytoplasme de la bactérie (Sprenzel et al., 2000). Il est codé par le locus *iro* qui comprend les gènes *iroBCDEN* qui contribuent à la

virulence des souches ExPEC (Russo et al., 2001). Ces gènes ont été identifiés chez les APEC (Mellata, 2013) dont 82% des souches sont positives au locus *iro* tandis que chez les souches commensales ils ne représentaient que 31% (Caza et al., 2008).

La salmocheline est une variante de l'entérobactine qui a été modifiée par glucosylation par l'action de la glucosyltransferase encodée par le gène *ireA*.

La yersiniabactine est un phénolate sidérophore synthétisé par la machinerie enzymatique codée par le gène *fyuA*. Ce gène est largement distribué chez les souches d'*E. coli*, où 80% des souches ExPEC isolées des septicémies, méningites et cystites le portent (Wiles et al., 2008a). Ce gène est aussi largement représenté chez les souches APEC (Dziva and Stevens, 2008).

Les autres systèmes d'acquisition et de transport du fer sont: le système de transport de fer encodé par le locus *sitABC*, et les gènes *fepA-G* (Ferric-Enterobactin Protein) qui participent à la synthèse des récepteurs membranaires de l'entérobactine FepA et FepB facilitant l'entrée du fer dans la bactérie (Sprenzel et al., 2000). Le gène *fepC*, et plus récemment *fepA*, ont été associés aux APEC; leur présence dans l'utérus des vaches n'a pas encore fait l'objet d'études. Les gènes *sitABCD* codent pour un système de transport du fer et du manganèse et leur présence confère à la bactérie une résistance aux effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène (Sabri et al., 2008). Ces différents gènes des systèmes de captation et de transport du fer jouent un rôle important dans la virulence des ExPEC, et coexistent fréquemment chez la même bactérie (Johnson et al., 2006; Mellata et al., 2010). L'expression des gènes codant pour ces récepteurs et systèmes a été plus grande pendant une infection expérimentale du tractus urinaire chez la souris (Welch et al., 2002). Cela suggère l'importance de la capture du fer lors d'une infection des ExPEC.

2.5.2 Les adhésines

Les adhésines confèrent à la bactérie la capacité de s'attacher aux récepteurs spécifiques de l'hôte, une étape clé dans la pathogénèse de l'infection. Par conséquent, leur fonction est très importante dans la colonisation des surfaces et pendant l'infection. Il existe plusieurs types d'adhésines chez les ExPEC, dont les plus fréquents sont les fimbriae de type 1 et les fimbriae P (Blomfield, 2001).

a) Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont les structures somatiques que l'on trouve chez *E. coli* et plusieurs autres entérobactéries. Ils sont impliqués dans la première étape de la colonisation des épithéliums (Wooley et al., 1998) et sont codés par le locus *fim* qui est un opéron formé de 9 gènes (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimI*, *fimF*, et *fimH*). Ces gènes codent pour les sous-unités de structure, les chaperons et les protéines régulatrices de l'expression des fimbriae (Blomfield, 2001). Les études ont montré que les fimbriae de type 1 sont fréquents chez les ExPEC (Ewers et al., 2004; Johnson and Russo; 2005; Chapman et al., 2006), et particulièrement chez les APEC où le gène est présent sur 70 à 100% des souches (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

b) Les adhésines P

Les adhésines de la famille P se définissent sur la base de leurs propriétés d'agglutination des érythrocytes humains du groupe sanguin P. Elles ont été décrites chez les *E. coli* et la présence chez certains sous-groupe des ExPEC tels que les UPEC et les APEC a été démontré (Ewers et al., 2004; Ewers et al., 2007). Les fimbriae P sont codés par différents opérons dont les plus étudiés sont les opérons *papet prs*. Le gène *papC* a une séquence commune à tous les fimbriae de cette famille et est utilisé dans le PCR pour détecter le fimbriae (Blum et al., 1995). Contrairement au fimbriae de type 1, le fimbriae P serait moins fréquent chez les APEC (Dziva and Stevens, 2008).

c) Autres adhésines

Il existe plusieurs autres types d'adhésine qui participent soit simultanément soit seules, à la colonisation des surfaces de l'hôte. La présence de certaines telles que les fimbriae AC/1, F17, Afa, Sfa, Eae, a déjà été démontrée chez les ExPEC, précisément chez les APEC (Ewers

et al., 2004; Amabile de Campos et al., 2005; McPeake et al., 2005; Ewers et al., 2007) et chez les UPEC (Wiles et al., 2008b).

2.5.3 La capsule K1

Les souches ExPEC et tout particulièrement les MNEC et les APEC sont fréquemment encapsulées. La capsule K1 a été rapportée comme l'un des facteurs de virulence les plus déterminant chez les APEC (Mellata et al., 2003) car elle permet à la bactérie de résister au système immunitaire pendant la phase d'infection. Il existe plus de 80 types antigéniques de capsules (antigènes « K »). La capsule est constituée de couches de polysaccharides assemblés à la surface de la bactérie. Elles interfèrent avec l'action du complément et des phagocytes. Dans certains cas, la capsule est faiblement immunogénique (Jann and Jann, 1992).

2.5.4 Les toxines

Les ExPEC sécrètent de nombreuses toxines parmi lesquelles l'hémolysine alpha (HlyA), le "secreted autotransport toxin" (Sat), le "vacuolating autotransport toxin" (Vat), et les "Cytotoxiques necrotin factors" (CNF 1 et 2) sont les plus importantes (Ewers et al., 2007; Wiles et al., 2008b).

a) L'hémolysine. L'hémolysine est codée par le cluster *hly* que l'on retrouve chez 50% des souches UPEC et sa présence est associée à une augmentation de la sévérité des signes cliniques dans les infections urinaires (Marrs et al., 2005). Ce cluster contient plusieurs gènes dont le gène *hlyA* qui code pour l'hémolysine alpha, une toxine très souvent retrouvée chez les ExPEC, sécrétée par un système de sécrétion de type I. La toxine HlyA s'insère dans la membrane cellulaire et y forme des pores provoquant ainsi une mort cellulaire (Wiles et al., 2008a).

b) Vat et Sat. Les ExPEC produisent aussi des toxines de type V, de la famille des auto-transporteurs. Deux de ces toxines, Vat et Sat, sont souvent sécrétées par les UPEC (Ewers et al., 2007). Le rôle de Vat dans la pathogénèse d'une infection extra-intestinale n'a pas encore été bien identifié. Par contre, la toxine Sat provoque un dommage sévère dans les reins; perte de la membrane glomérulaire, perte de l'épithélium des tubules, une vacuolisation du tissu, mais sans avoir un rôle déterminé dans la colonisation de la bactérie (Guyer et al., 2002; Maroncle et al., 2006).

Ainsi, les souches ExPEC sont donc hautement spécialisées pour causer des dommages dans l'environnement extra-intestinal. Elles utilisent un répertoire de gènes (Tableau I) qui codent pour les facteurs de virulence, leur permettant d'envahir et coloniser de nombreux organes dont l'utérus, et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

2.5.4 Les gènes de virulence des ExPEC d'origine utérine

Les ExPEC ont été déjà isolés dans l'utérus des vaches souffrant de métrites postpartum (Azawi, 2008; Földi et al., 2006). Tandis que les autres souches ExPEC colonisant d'autres organes ont déjà été bien caractérisées de manière à leur assigner des sous-groupes spécifiques (UPEC, APEC, MNEC), les souches ExPEC qui colonisent et causent des infections dans l'utérus on fait l'objet de très peu d'études (Bicalho et al., 2010; Sheldon et al., 2010). Cependant, certains gènes de virulence des ExPEC ont déjà été mis en évidence chez les *E. coli* présents dans l'utérus des vaches (Tableau II). Le gène *fimH* a été identifié chez 87% des *E. coli* isolés de l'utérus des vaches souffrant de métrite postpartum; la même étude a montré que la présence des gènes *fimH*, *hlyE*, *kpsMTII*, *ibeA*, chez les *E. coli* intra-utérin multiplie le risque de développement de la métrite postpartum chez la vache (Bicalho et al., 2010).

Tableau II: Gènes de virulence déjà mis en évidence chez les *E. coli* intra-utérin chez la vache laitière

Gènes de virulence	Facteur/fonction	Référence
<i>hlyE</i> , <i>hlyA</i> <i>iucD</i> <i>eaeA</i>	Hémolysine/toxine Sidérophores/capture du fer Intimine/ attachement-effacement	Silva et al., 2009
<i>fyuA</i>	Sidérophores/capture du fer	Sheldon et al., 2010
<i>fimH</i> <i>cdt</i> <i>kpsMII</i> <i>ibeA</i> <i>hlyA</i> <i>astA</i>	Fimbriae Type 1/adhésion holotoxine Capsule/résistance invasion α hémolysine EAST1/entérotoxine	Bicalho et al., 2010

3 Problématique, hypothèses et objectifs de l'étude

3.1 Problématique

Les méthodes de diagnostics classiques telles que la palpation transrectale de l'utérus et l'observation de l'écoulement vaginal permettent de diagnostiquer la métrite postpartum lorsque les signes cliniques sont déjà visibles. L'observation des signes cliniques sont souvent suivis des tests bactériologiques pour confirmer une infection bactérienne. Or, lorsque les signes cliniques apparaissent, les bactéries ont déjà causé suffisamment de dommage. Pour prévenir la métrite postpartum de manière à limiter les pertes en lait et en reproduction, il est nécessaire de développer des tests de dépistage précoces qui permettront aux éleveurs d'identifier, avant l'apparition des signes cliniques, les vaches qui ont un risque élevé de développer la métrite postpartum. Étant donné que la contamination bactérienne de l'utérus s'effectue dès les premiers jours postpartum et que certaines espèces bactériennes et leur gènes de virulence ont été associés au développement subséquent de la métrite postpartum, la détection de ces bactéries et de leurs gènes de virulence dès la première semaine postpartum pourrait aider à identifier les vaches prédisposées à la métrite postpartum dans les semaines postpartum.

3.2 Hypothèses

La présente étude est basée sur les hypothèses suivantes:

i) La présence de certaines espèces bactériennes dans l'utérus dès la première semaine postpartum serait associée à une augmentation de l'incidence de la métrite postpartum chez la vache laitière.

ii) Certains gènes de virulence spécifique d'*E. coli* prélevés durant la première semaine postpartum seraient associés à une augmentation de l'incidence de la métrite postpartum chez la vache laitière.

iii) L'identification précoce de ces espèces bactériennes et des gènes de virulence d'*E. coli* pourrait permettre d'identifier précocement les vaches à risque élevé de développer la métrite postpartum.

3.3 Objectifs de l'étude:

Les 'objectifs de cette étude sont donc de:

i) Déterminer s'il existe une association entre la présence des bactéries dans l'utérus des vaches laitières durant la 1^{ère} semaine postpartum et le développement ultérieur de la métrite postpartum.

ii) Déterminer s'il y a une association entre les gènes de virulence d'*E. coli* et le développement de la métrite postpartum.

iii) Évaluer si l'utilisation des résultats d'analyses bactériologiques (bactéries et gènes de virulence d'*E. coli*) pourrait servir à prédire l'apparition subséquente de la métrite postpartum chez la vache laitière.

Ma contribution dans cette étude

Isolement et préparation des isolats de *E. coli* pour la technique d'hybridation des sondes radioactives sur colonie.

Préparation des sondes des gènes à tester par la technique PCR et purification des produits de PCR.

Réalisation de la technique d'hybridation des sondes sur colonies pour la détection des gènes de virulence de *E. coli*.

Analyses statistiques des résultats par XLSTAT pour l'étude de la prévalence des gènes et des associations des gènes de virulence d'*E. coli*.

Rédaction du résumé et poster pour la Journée Scientifique de la FMV.

Rédaction du résumé et présentation orale pour le congrès su Réseau Canadien des Travailleurs de Laboratoire qui a eu lieu du 26 au 29 mai 2013 à la FMV.

Rédaction du résumé et présentation orale pour le 2nd International Congress of pathogens at Human and Animal Interface (ICOPHAI) du 14 au 17 Août 2013 au Brésil.

Rédaction de l'article: The virulence profile of *Escherichia coli* could be used to predict metritis in postpartum dairy cows.

ARTICLE EN PREPARATION

The virulence profile of *Escherichiacoli* could be used to predict postpartum metritis in dairy cows

¹Flavien Ndongokassé, ¹John. Morris. Fairbrother, ²Jocelyn Dubuc

¹: OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

²: Department of clinical sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

ABSTRACT

The objectives of this study were to (1) determine whether there is an association between the presence of intra-uterine *Escherichia coli* in the first week postpartum and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, (2) determine whether there is an association between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis, and (3) to assess whether the presence of these *E. coli* virulence genes could predict the occurrence of postpartum metritis in dairy cows. Uterine swabs were collected in the first week postpartum from 497 Holstein cows and submitted to the laboratory for detection of *E. coli*. Virulence genes of *E. coli* were identified using the radioactive probe hybridization method. A total of 261 cows (52%) were positive for intra-uterine *E. coli* and 67 cows (13.5%) were positive for postpartum metritis. Cows positive for intra-uterine *E. coli* in the first week postpartum had 2.6 times the odds of developing postpartum metritis compared to negative cows. Most intra-uterine *E. coli* possessed one or more ExPEC genes, among which *FimH* (89%), *hlyE* (87%), and *iss* (70%). Other ExPEC genes such as *sitA* (23%), *fePC* (20%), *hral* (20%), *malX* (14%), *tsh* (11%) and others were found with low prevalence. The presence of the virulence genes *kpsMTII* and *hral* was associated with 4.3 times each the odds of developing postpartum metritis compared to negative cows. The presence of *E. coli* in the uterus had a positive predictive value of 18%, while the presence of the genes *kpsMTII* and *hral* had a positive predictive value of 36% and 31% respectively. The detection of certain virulence genes of *E. coli* in uterine swabs could inform about the risk of developing postpartum metritis in dairy cattle. Further studies could test more virulence genes and aim at developing molecular tests that would be simple, quickly and easily applicable on farm.

Key words: *E. coli*, virulence genes, postpartum metritis, dairy cow

INTRODUCTION

A wide variety of bacterial species can be found in the uterine lumen of the dairy cow during early postpartum period (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2008). These include *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, streptococci, staphylococci, *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp. and various gram-negative anaerobes such as *Fusobacterium necrophorum* and *Prevotella melaninogenicus* (Noakes et al., 1991; Bondurant, 1999; Williams et al., 2005). The presence of these bacteria varies over time during postpartum period; the overall population generally declining during the first 50 days after parturition (Elliott et al., 1968; Griffin et al., 1974b; Sheldon et al., 2002b). Failure to control or eliminate completely this uterine bacterial infection can lead to the development of postpartum metritis (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006).

Postpartum metritis is a severe inflammation involving all layers of the uterus, (endometrium, submucosa, muscularis, and serosa) and is caused by a bacterial infection in the lumen of the uterus (Sheldon, 2004). Postpartum metritis generally occurs during the first 21 days after parturition in dairy cattle and is defined by the presence of a fetid watery red-brown vaginal discharge with fever, body temperature being $> 39.5^{\circ}\text{C}$, and systemic signs of illness, such as dullness and anorexia (Sheldon et al., 2006; LeBlanc, 2008). The consequences of postpartum metritis in dairy farms are: reduced milk production, low reproductive performances and increased production costs due to antimicrobial used to overcome the disease (LeBlanc, 2008, Overton and Fetrow, 2008). Bacterial species frequently associated with the occurrence of postpartum metritis are *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum*, and *P. melaninogenicus* (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2002a ; Földi et al., 2006). The relative role of each of these bacterial species in the pathogenesis of postpartum metritis is not well understood. It has been suggested that *E. coli* could play an important role as it is frequently found in the uterus in early stages of the disease, and its presence has been associated with the occurrence of severe uterine lesions, and subsequent infertility (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2002a).

Recent studies have demonstrated that certain *E. coli* virulence genes, such as *cdt*, *astA*, *ibeA*, *hlyA*, *hlyE*, *fyuA*, *fimH*, are associated with postpartum metritis (Silva et al., 2009; Bicalho et al., 2010; Sheldon et al., 2010). It has been suggested that the products of these

virulence genes may mediate induction of lesions in the uterine mucosa or promote the growth of opportunistic bacterial species such as *T. pyogenes* and *F. necrophorum*, which may act synergistically with *E. coli* to induce clinical signs of postpartum metritis (Sheldon et al., 2010).

Early identification of cows at high risk of developing postpartum metritis could help to prevent or reduce the negative impact of this disease, and minimise antimicrobial use on dairy farms. Early postpartum uterine bacteriological analysis, including detection of *E. coli* virulence genes, is readily available to veterinary practitioners and could be used for early identification of high-risk cows. Unfortunately, few data are available to allow the evaluation of such approach. Therefore, the objectives of this study were to: Determine the bacterial species present in the uterus of dairy cows during the 1st week postpartum and their association with postpartum metritis, determine the relationship between *E. coli* virulence genes and the subsequent development of postpartum metritis and determine the accuracy of using early postpartum uterine bacteriology results (Bacteria and virulence genes) to predict the development of postpartum metritis in dairy cows.

MATERIALS AND METHODS

1 Farm selection and sample collection

A prospective cohort study was conducted between September 2011 and September 2012 on 6 commercial Holstein dairy farms. Farm selection was based on motivation of the farmers to diagnose and report uterine diseases, and on convenience of being located within 30 km of the bovine ambulatory clinic of the Faculté de médecine vétérinaire (FMV), Université de Montréal (St-Hyacinthe, Qc, Canada). Participating herds had computerized health event records, and were enrolled on a bi-weekly herd health veterinary program and a monthly testing of dairy herd Improvement program (DHIA). Half of the farms (n = 3) had free stall housing whereas the other half had tie stall barns (n = 3).

Farms were visited weekly by a research technician and a veterinarian. During farm visits, all cows in their first week postpartum (between 1 and 7 days after parturition) were enrolled in the study. An estimated sample size of 500 cows was targeted for the study. Sample size calculation was based on finding a significant difference (error alpha: 5%; error beta: 20%) in postpartum metritis prevalence between cows carrying *E. coli* positive for a specific virulence gene (postpartum metritis: 35%) and those not carrying such *E. coli* (postpartum metritis: 15%), and expecting a prevalence of 15% of this virulence gene in the studied population. Enrolled cows were sampled once during the study. For uterine sampling, cows were restrained and the perineum was cleaned and disinfected with 70% ethyl alcohol solution (Isopropyl Alcohol 70% USP; Green Field Inc, Brampton, Ontario, Canada). A sterile double-guarded uterine swab (Guarded culture swab; Jorvet Inc, Loveland, Colorado, USA) was introduced in the vagina until it reached the body of the uterus. The swab was then exposed to the dorsal aspect of the uterine wall and pulled back inside its sheath. The swab was then placed in an anaerobic transportation medium (BBL Port-A-Cul Tubes; Becton, Dickinson and company, Sparks, Maryland, USA) and kept at 4°C until submission to the veterinary diagnostic laboratory of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, Qc, Canada) within 12 hours of collection. Procedures of sample collections were approved by the animal care committee of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, Qc, Canada).

2 Bacteria isolation

For isolation of *T. pyogenes*, uterine swabs were plated on colombia blood agar (OXOID, Ottawa, ON, Canada) and incubated aerobically at 35°C for 48 hours. Beta-hemolytic, catalase-negative minuscule colonies demonstrating Gram-positive coryneform rods were identified as *T. pyogenes*. *Fusobacterium necrophorum* and *P. melaninogenicus* were isolated according to the PON-BAC-019 procedure commonly used in the veterinary diagnostic laboratory of the FMV. Briefly, swabs were plated on Brucella agar containing Neomycin (100 g/ml) and incubated anaerobically at 35°C for 5 days. When Gram-negative rods were observed, colonies were examined using the API 20 A gallery for identification of *F. necrophorum* and *P. melaninogenicus*. For isolation of *E. coli*, swabs were plated on blood agar and MacConkey agar (OXOID, Ottawa, ON, Canada) at 37°C. At the OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL – Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal), 5 typical lactose-positive *E. coli* colonies from the MacConkey agar plates were streaked on blood agar for isolation and further identification. Isolates were submitted to 3 biochemical tests, indol spot, Simon citrate, and motility, for confirmation of *E. coli*. Isolates of *E. coli* were stored in Tryptic Soy Broth containing 30% glycerol at –80°C (Becton, Dickinson and company, Sparks, Maryland, USA) for further analysis.

3 Identification of *E. coli* virulence genes by colony hybridization

Virulence genes were detected in isolates by colony hybridization using radioactively labeled (³²P) DNA probes. Procedures were performed according to a protocol of the OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL – Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) and as described previously (Harel et al., 1991). Briefly, *E. coli* isolates in TSB were spotted onto Luria-Bertani agar and incubated at 37°C over night. The colonies were then transferred to Whatman 541 filter paper (Whatman, Piscataway, NJ, USA). The filters were processed, hybridized, and visualized by autoradiography.

Probes were derived from *E. coli* control strains by uniplex PCR, using the primers of the tested genes (Table I). After amplification, PCR products were purified and concentrated, using "QIAquick PCR Purification Kit" according to manufacturer's instructions. After purification, probes were marked with phosphate 32 (³²P) using a specific kit (Amersham Ready to go DNA Labelling Beads), according to manufacturer's instructions.

Samples were analysed chronologically (first in, first out); a total of 815 *E. coli* isolates from the first 163 samples positive for *E. coli* (5 isolates from each positive uterine sample) were examined for the presence of virulence genes using colony hybridization. *Escherichia coli* isolates having the same virulence gene profile in a given sample were considered as the same strain. Thus, a total of 32 virulence genes and 214 different combination of these virulence genes were identified in 413 *E. coli* strains.

4 Postpartum metritis diagnosis

Before the start of the study and every 3 months during data collection, the definition of postpartum metritis was reviewed and standardized with participating farmers. Postpartum metritis was defined as the presence of a fetid watery red-brown uterine discharge, associated with fever (rectal temperature $>39.5^{\circ}\text{C}$), and systemic signs of illness (dullness, reduced appetite and milk production) within the first 21 days after parturition. One person per farm was assigned the task to clinically diagnose postpartum metritis and to report it in individual health records (DSAHR, St-Hyacinthe, Qc, Canada).

5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SAS (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The experimental unit of the study was the cow and postpartum metritis was considered as the dependent variable. Individual data such as parity group (first, second or greater), season of calving (cold season: October to March; warm season: April to September) were exported from the computerized record system into SAS. Descriptive statistics were calculated using the FREQ procedure. Significance was declared when $P \leq 0.05$.

5.1 Univariable analyses

Univariable analyses (Chi-square; FREQ procedure) were performed to screen for associations between risk factors and postpartum metritis, bacterial species and postpartum metritis, and between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis. Variables with $P \leq 0.25$ were retained for multivariable modeling.

5.1.1 Association between risk factors and postpartum metritis

Risk factors included were: parity number, calving season, and farm. For parity number, cows were classified in 2 categories: category "1" for primiparous and category "2" for multiparous. For seasons; cows that calved between November and March were classified as having calved in the cold season whereas those which calved between May and August were classified as having calved in the warm season. Different models were built to compare the prevalence of postpartum metritis in each farm.

5.1.2 Association between bacterial species and postpartum metritis

Cows were grouped according to the presence and absence of each bacterial species. Univariable associations between postpartum metritis and bacterial species were tested.

5.1.3 Association between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis

This analysis was conducted in 2 steps in order to measure the effect of each *E. coli* virulence gene from 2 different perspectives:

The 1st step measured the effect of each virulence gene within the population of cows positive for *E. coli*. Therefore, only cows positive for *E. coli* and tested for *E. coli* virulence genes (n = 163) were included in this analysis. These cows were classified into 2 categories: "0" when the cow was culture-positive for *E. coli* but the virulence gene was absent in all *E. coli* isolates, and "1" when the culture was positive for *E. coli* and the virulence gene was present in at least one *E. coli* isolate. The prevalence of postpartum metritis in cows positive for *E. coli* carrying a particular virulence gene was compared to the prevalence of postpartum metritis in cows positive for *E. coli* that did not carry that particular virulence gene.

The 2nd step measured the ability of each *E. coli* virulence gene to predict cows at high risk for postpartum metritis within the whole population of cows (n = 486). In this analysis, cows were classified in 2 categories: "1" when the culture was positive for *E. coli* and the virulence gene was present in at least one *E. coli* isolate, and category "0" included both cows negative for *E. coli* and cows positive for *E. coli* but the virulence gene was absent in all *E. coli* isolates. All cows enrolled in the study were included in this analysis.

5.2 Multivariable analyses

Multivariable logistic regression models (GLIMMIX procedure) were performed to evaluate the associations between pre-screened ($P \leq 0.25$) independent variables (risk factors, bacterial species, and virulence genes) and postpartum metritis. A backward elimination strategy was used to build the final models until only variables with $P \leq 0.05$ were retained. One final model including all cows enrolled in the study was built for bacterial species and risk factors. Two final models were built for *E. coli* virulence genes. The first model included only positive cows for *E. coli* whereas the second model included all cows. All final models accounted for the effect of herd clustering (random) and parity (forced variable).

Finally, the accuracy of using final model predictors (bacterial species and virulence genes) was calculated individually or in combination for predicting postpartum metritis using sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (FREQ procedure).

RESULTS

1 Descriptive Statistics

A total of 486 postpartum dairy cows were sampled and enrolled in this study. Most samples were collected from 3 free stall farms (147, 174, and 135 samples from farms 1, 2 and 3, respectively; farm size ranged from 200 to 240 lactating cows) and a minority of samples were collected from 3 tie stall farms (11, 8 and 11 samples from farms 4, 5 and 6, respectively; farm size ranged from 50 to 120 lactating cows). Sampled cows were from different parity groups, 165 (34%) were primiparous and 321 (66%) were multiparous. Day in milk (DIM) at which clinical signs of postpartum metritis were observed ranged from 3 to 20, with an average of 8 ± 4 days. The overall prevalence of postpartum metritis in this study was 13.7 % (n = 67); this prevalence was higher in primiparous cows (21%) than in multiparous cows (10 %; $P < 0.001$). Cows that calved in the cold season also had higher prevalence of postpartum metritis (16 %) than cows that calved in the warm season (10 %; $P < 0.06$). Overall, 52% (n = 252) of uterine samples were positive for *E. coli*, 169 (34.7%) of the samples were positive for *T. pyogenes* and less than 3% of samples were positive for *F. necrophorum*. Overall, 34% of uterine samples were bacteriologically negative (Table II).

1.2 *Escherichia coli* virulence genes

A total of 32 virulence genes and 214 virulence genes profiles were identified in 413 *E. coli* strains. The number of virulence genes present in one strain varied from 1 to 15. Overall, the most prevalent virulence associated genes among the 413 *E. coli* strains were those encoding for iron acquisition factors such as *sitA* (23%; n = 95), *fepC* (20%; n = 82) *irp2* (11%; n = 45), and toxins such as *hlyE* (87%; n = 359), *east1* (17%; n = 70), *cdtB* (12%; n = 49). Some genes encoding for bacterial adherence were also found, including *fimH* (89%; n = 367), *hral* (21%; n = 86), *papC* (9%; n = 37). A summary of the virulence gene found in the uterine *E. coli* in the present study is shown in Figure 1.

2 Univariable associations

2.1 Association between bacterial species and postpartum metritis

The prevalence of postpartum metritis in cows that were positive for *E. coli* or *T. Pyogenes* or both in the 1st week postpartum was higher than in cows bacteriologically negative (Table III).

2.2 Association between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis

This analysis was performed in 2 steps. The 1st step measured the association between each virulence gene and postpartum metritis within the population of cows positive for *E. coli* (n = 163). Table IV presents virulence genes with $P \leq 0.25$. Cows positive for *E. coli* carrying virulence genes *iroN*, *hral*, *f17*, or *kpsMTII* had a higher prevalence of postpartum metritis compared to cows positive for *E. coli* that did not carry these genes.

The 2nd step measured the association of each *E. coli* virulence gene with postpartum metritis within all cows (n = 486). Table V presents the virulence genes with $P \leq 0.25$. Cows that were positive for *E. coli* carrying virulence genes *iroN*, *hral*, *f17*, *kpsMTII* or *fimH* in the 1st week postpartum had a higher prevalence of postpartum metritis compared to cows that were bacteriologically negative or negative for these *E. coli* virulence genes (Table V).

3 Multivariable associations

3.1 Multivariable association between bacterial species and postpartum metritis

Controlling for farm and parity group effects, *E. coli* was the only bacterium associated with postpartum metritis. Cows infected with intra-uterine *E. coli* in the 1st week postpartum had 2.6 times (95% CI: 1.4-4.6; $P < 0.01$) the odds of having postpartum metritis compared to cows that were bacteriologically negative at sampling.

3.2 Multivariable association between *E. coli* virulence genes and postpartum metritis

In a first step, only cows that were positive for *E. coli* and tested for *E. coli* virulence genes (n = 163) were included in the model. Controlling for herd and parity group effects, the virulence gene *hral* was the only variable associated with postpartum metritis that was retained in the final model. Cows positive for intra-uterine *E. coli* carrying *hral* had 2.3 times (95% CI:

1.1-5.0; $P < 0.01$) the odds to be diagnosed with postpartum metritis than cows positive for *E. coli* that did not carry *hral*.

In a second step, all cows enrolled in the study were used for modelling (n = 486). The presence of *hral* and *kpsMTII* were significantly associated with postpartum metritis in the final model. Cows positive for intra-uterine *E. coli* carrying *hral* or *kpsMTII* were 4.3 (95% CI: 2.1-9.0; $P < 0.01$) and 4.3 (95% CI: 2.2-15.0; $P = 0.02$) times more likely to have postpartum metritis, respectively, than cows not carrying these virulence genes.

The accuracy of using results for *E. coli*, *hral*, *kpsMTII* or a combination of these virulence genes was calculated. Our results showed that 36% of cows positive for intra-uterine *E. coli* carrying *kpsMTII* would develop postpartum metritis in the coming weeks, whereas 86% of cows negative for *E. coli* carrying *kpsMTII* would not develop postpartum metritis. For *hral*, 31% of cows positive for intra-uterine *E. coli* carrying *hral* during the 1st week postpartum would develop postpartum metritis in the 2nd or 3rd weeks postpartum, whereas 87% of cows negative for intra-uterine *E. coli* carrying *hral*, would not develop postpartum metritis (Table VI).

DISCUSSION

This study was one of the first to test a large number of *E. coli* virulence genes (40) on a large number of *E. coli* isolates (812) collected from a large number of postpartum dairy cows (486). It is also the first study that calculated the sensitivity, specificity and predictive values of using *E. coli* virulence genes to predict postpartum metritis.

Using multivariable analysis to account for the effects of farm and parity group, this study showed that the presence of *E. coli* in the uterus of cows during the first week postpartum increased by 2.6 times the odds of having postpartum metritis compared to bacteriologically negative cows. This finding was expected as it has been reported previously (Werner et al., 2012). Interestingly, in univariable analyses, the presence of *E. coli*, *T. pyogenes* or both bacterial species was associated with postpartum metritis. This confirms the results of previous studies in which the presence of various bacterial species, including *E. coli* and *T. pyogenes*, in uterus was associated with the subsequent development of postpartum metritis (Sheldon, 2004; Földi et al., 2006; Azawi, 2008; Werner et al., 2012). Surprisingly, in multivariable analysis, *T. pyogenes* was no more associated with postpartum metritis. This observation could be explained by the multi-factorial character of the disease. In fact, previous studies have reported that factors such as farm management (Dubuc et al., 2010) and parity group (Bruun et al., 2002; Potter et al., 2010) could influence the occurrence of postpartum metritis in dairy farms.

Other risk factors associated with postpartum metritis are dystocia, twinning, retained placenta, stillbirth, abortion, prolapsed uterus, increased non esterified fatty acids prepartum, and reduced feeding time and DMI before parturition; (Urton et al., 2005; Huzzey et al., 2007; Dubuc et al., 2010). Many of these risk factors are probably associated with an increased uterine bacterial contamination soon after parturition, but also with a decreased efficacy of the immune system. For example, elevated prepartum non esterified fatty acid concentration and reduced prepartum DMI were found to be associated with a poorer efficacy of neutrophil functions (Sheldon et al., 2009; Silvestre et al., 2011). Potentially, cows with a strong uterine immune defence are able to eliminate bacteria rapidly after contamination occurs, whereas, bacteria might persist and cause postpartum metritis in cows with a weak uterine immune defence (Földi et al., 2006; Azawi, 2008). Our study showed that primiparous cows were more likely to have postpartum metritis than multiparous cows. A similar finding has also been

reported previously by Bruun et al. (2002) and Potter et al. (2010). According to these authors, primiparous cows are more likely to experience dystocia; therefore they may have greater uterine bacterial contamination compared to multiparous cows.

Although the relationship between the presence of *E. coli* in the postpartum uterus and the prevalence of postpartum metritis has already been reported (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2002a; Williams et al., 2007; Werner et al., 2012), few studies have attempted to elucidate the etiological role of *E. coli* in the development of postpartum metritis. Our hypothesis was that the presence of certain virulence genes would play a role in the etiology of postpartum metritis and would be associated with the development of disease. Interestingly, Silva et al. (2009) tested 15 virulence genes on intra-uterine *E. coli* and found no association with postpartum metritis for any of the virulence genes tested. Sheldon et al. (2010) tested 17 virulence genes, including *kpsMTII*, and found no association with postpartum metritis. In contrast, Bicalho et al. (2010) evaluated 32 *E. coli* virulence genes in intra-uterine *E. coli* isolates and found that 6 virulence genes (*fimH*, *hlyA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA*, *astA*) were associated with postpartum metritis. In our study, 40 virulence genes of *E. coli* were tested and only 2 (*kpsMTII* and *hra1*) were significantly associated with postpartum metritis. It is important to keep in mind that all these studies were conducted in different locations, with different sample sizes, and that they did not all test for the same *E. coli* virulence genes; this could partially explain the discrepancy between the results.

The virulence gene *kpsMTII* encodes for the capsular proteins K1 or K5 allowing bacteria to escape phagocytosis. The presence of *kpsMTII* has been associated with cellulitis in chickens (de Brito et al., 2003) and urinary tract infections (UTI) in women (Moreno et al., 2005; Moreno et al., 2009). Recently, the presence of *kpsMII* was found to be associated with postpartum metritis in dairy cows (Bicalho et al., 2010). Therefore, it was not surprising to find an association between this virulence gene and postpartum metritis in our study. However, Sheldon et al., (2010) did not find an association between *kpsMTII* and postpartum metritis. It is important to note that this study was conducted on only 64 dairy cows in the Royal Veterinary College dairy herd (United Kingdom), where cows were kept in controlled conditions; whereas in our study and that of Bicalho, samples were collected from 486 dairy cows from 6 dairy herds and 374 dairy cows from 4 dairy herds respectively, belonging to private farmers where cows are not kept in controlled conditions. This could explain the

difference in the results. Specifically, *kpsMIII* was found in 13.2% of cows that developed postpartum metritis in the present study, being comparable to the prevalence of 12.5% reported by Bicalho (2010), a prevalence of 16% found in chickens with cellulitis (de Brito et al., 2003), and a prevalence of 21% found in UTI in humans (Johnson et al., 2002).

Another virulence gene associated with postpartum metritis in the present study was *hral* which encodes for the heat-resistant-agglutinin 1 located on the outer membrane of the bacteria. The virulence gene *hral* has been reported in uropathogenic *E. coli* strains and neonatal meningitis *E. coli* strain RS218 (Bhargava et al., 2009). Dobrindt et al. (2002) reported that 43.5% of uropathogenic *E. coli* isolates and 32% of human and animal *E. coli* isolates from meningitis and sepsis possessed the gene *hral* in their genome. Moreover, *hral* has been reported from 52% of *E. coli* isolates from urinary tract infections, 65% of pyelonephritis isolates, and 22% of rectal isolates (Srinivasan et al., 2003). Recently, *hral* has also been found in Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) isolated from humans (Bhargava et al., 2009). Although this gene was found in various *E. coli* strains, its role in colonization and virulence has only been conclusively studied in the NMEC strain RS218 (Fagan and Smith, 2007). The presence of this gene is sufficient to confer agglutination of human erythrocytes, bacterial autoaggregation, enhanced biofilm formation, aggregative adherence, and invasion of epithelial cells (Mancini et al., 2011). The present study is the first to report that the virulence gene *hral* from intra-uterine *E. coli* isolated from postpartum cows was associated with postpartum metritis. In our data, *hral* was present in 21% of the 413 *E. coli* strains collected from uterus of postpartum cows. It is possible that *hral* allows bacterial autoaggregation, leading to the formation of large aggregates of bacteria that cannot be phagocytised. This gene could also enhance formation of biofilms that persist on the uterine mucosa.

The common point between *kpsMTII* and *hral* could be that they allow *E. coli* to escape or resist to phagocytosis and persist in the uterine lumen. Therefore, the association of these two genes with postpartum metritis is in agreement with the thinking of several authors who conclude that, although bacterial contamination of the uterus occurs in over 90% of postpartum dairy cows (Paisley et al., 1986; Sheldon, 2004), it is the persistence of the bacteria in the uterine lumen that causes postpartum metritis (Griffin et al., 1974a; LeBlanc et al., 2002).

The association of *kpsMTII* and *hral* with postpartum metritis makes them potential early predictors of postpartum metritis in dairy cows. Our results highlight the point that not finding these virulence genes during the first week postpartum can provide high specificity and negative predictive values, but that the sensitivity and positive predictive values remain low. Although these results may seem disappointing, it is important to keep in mind that postpartum metritis is a complex multifactorial disease in which several factors are involved (Urton et al., 2005; Huzzey et al., 2007; Dubuc et al., 2010). Since bacterial contamination of the uterus is determinant (Dohmen et al., 2000; Földi et al., 2006), early postpartum uterine sampling to test for *E. coli*, *kpsMTII* or *hral* would provide an idea on the risk level of each cow for postpartum metritis. The use of a more rapid, table-top test to detect *E. coli*, *kpsMTII* and/or *hral* in uterine samples would greatly increase the usefulness of such an approach for veterinary practitioners.

CONCLUSION

The results of our study revealed that the presence of intra-uterine *E. coli* and of several *E. coli* virulence genes was associated with postpartum metritis in dairy cattle. In particular, an important EAEC virulence gene, *hral*, was prevalent among intra-uterine *E. coli* isolates and its presence increased significantly the odds of developing postpartum metritis. The virulence genes *hral* and *kpsMTII* were those most frequently associated with postpartum metritis and their presence could potentially be used to predict the disease in postpartum dairy cows. Although their accuracy to predict the occurrence of postpartum metritis in dairy cows remains low, their absence in the uterus can predict the absence of the disease more accurately. Further studies should attempt to better understand the impact of *kpsMTII*, *hral* and other virulence genes in the development of postpartum metritis in dairy cows and should also focus on developing easier and more rapid screening tests for detection of *E. coli* virulence genes in uterine samples on farm.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire (PSIA) from the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). The authors wish to thank Brigitte Lehoux, Gyslaine Vanier and Jean Philippe Pelletier, for their technical assistance and Guy Beauchamp for statistical analysis.

REFERENCES

- An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels, and J. Harel. 1999. Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473:179-184.
- Azawi, O. I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 105:187-208.
- Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen, and C. F. Marrs. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iroN (*E. coli*). *J. Infect. Dis.* 185:1521-1524.
- Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother, and J. Harel. 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J. Clin. Microbiol.* 34:144-148.
- Bhargava, S., B. B. Johnson, J. Hwang, T. A. Harris, A. S. George, A. Muir, J. Dorff, and I. N. Okeke. 2009. Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. *J. Bacteriol.* 191:4934-4942.
- Bicalho, R. C., V. S. Machado, M. L. S. Bicalho, R. O. Gilbert, A. G. V. Teixeira, L. S. Caixeta, and R. V. V. Pereira. 2010. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 93:5818-5830.
- Bondurant, R. H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77:101-110.
- Bruun, J., A. K. Ersbøll, and L. Alban. 2002. Risk factors for postpartum metritis in Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 54:179-190.
- Chapman, T. A., X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson, and J. J. Chin. 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4782-4795.
- Cid, D., R. Sanz, I. Marin, H. de Greve, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, R. Amils, and R. de la Fuente. 1999. Characterization of nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. *J. Clin. Microbiol.* 37:1370-1375.

- Daigle, F., J. Harel, J. M. Fairbrother, and P. Lebel. 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 40:286-291.
- De Brito, B. G., L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* 71:4175-4177.
- Dobrindt, U., G. Blum-Oehler, G. Nagy, G. Schneider, A. Johann, G. Gottschalk, and J. Hacker. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I (536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* 70:6365-6372.
- Dohmen, M. J. W., K. Joop, A. Sturk, P. E. J. Bols, and J. A. C. M. Lohuis. 2000. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 54:1019-1032.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:5764-5771.
- Elliott, L., K. J. McMahon, H. T. Gier, and G. B. Marion. 1968. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 29:77-81.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laternus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297:163-176.
- Fagan, P. K., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic. 1999. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:868-872.
- Fagan, R. P. and S. G. Smith. 2007. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* is an auto-aggregating adhesin and invasin. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:248-255.
- Földi, J., M. Kulcsar, A. Pecci, B. Huyghe, C. de Sa, J. A. Lohuis, P. Cox, and G. Huszenicza. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96:265-281.

- Furrer, B., U. Candrian, and J. Luthy. 1990. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* 10:31-34.
- Girardeau, J. P., Y. Bertin, C. Martin, M. Der Vartanian, and C. Boeuf. 1991. Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. *J. Bacteriol.* 173:7673-7683.
- Griffin, J. F., P. J. Hartigan, and W. R. Nunn. 1974a. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1:91-106.
- Griffin, J. F., P. J. Hartigan, and W. R. Nunn. 1974b. Non-specific uterine infection and bovine fertility. II. Infection patterns and endometritis before and after service. *Theriogenology* 1:107-114.
- Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne, and J. M. Fairbrother. 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* 66:177-182.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and J. B. Neilands. 1988. Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the *pColV-K30* aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. *J. Bacteriol.* 170:56-64.
- Huzzey, J. M., D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. G. von Keyserlingk. 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 90:3220-3233.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, T. T. O'Bryan, and J. N. Maslow. 2002. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185:1439-1447.
- Lalioui, L., M. Jouve, P. Gounon, and C. Le Bouguenec. 1999. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.* 67:5048-5059.

- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet. J.* 176:102-114.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2002. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85:2223-2236.
- Le Bouguenec, C. and Y. Bertin. 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30:317-342.
- Lortie, L. A., J. D. Dubreuil, and J. Harel. 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:656-659.
- Mancini, J., B. Weckselblatt, Y. K. Chung, J. C. Durante, S. Andelman, J. Glaubman, J. D. Dorff, S. Bhargava, R. S. Lijek, K. P. Unger, and I. N. Okeke. 2011. The heat-resistant agglutinin family includes a novel adhesin from enteroaggregative *Escherichia coli* strain 60A. *J. Bacteriol.* 193:4813-4820.
- Moreno, E., J. R. Johnson, T. Perez, G. Prats, M. A. Kuskowski, and A. Andreu. 2009. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes. Infect.* 11:274-280.
- Moreno, E., I. Planells, G. Prats, A. M. Planes, G. Moreno, and A. Andreu. 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53:93-99.
- Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:242-252.
- Noakes, D. E., L. Wallace, and G. R. Smith. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet. Rec.* 128:440-442.
- Oswald, E., M. Tabouret, R. Boivin, and J. De Rycke. 1994. Detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 40:209-218.

- Paisley, L. G., W. D. Mickelsen, and P. B. Anderson. 1986. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology* 25:353-381.
- Potter, T. J., J. Guitian, J. Fishwick, P. J. Gordon, and I. M. Sheldon. 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74:127-134.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36:241-256.
- Sheldon, I. M. 2004. The postpartum uterus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:569-591.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, and H. J. Schuberth. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81:1025-1032.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, and R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516-1530.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, D. U. Pfeiffer, and H. Dobson. 2002a. 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., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, and H. Dobson. 2002b. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* 151:531-534.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, M. H. Roberts, S. B. Price, R. O. Gilbert, and K. W. Simpson. 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.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. Miller, D. M. Nash, and S. Herath. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176:115-121.
- Silva, E., S. Leitão, T. Tenreiro, C. Pomba, T. Nunes, L. Lopes da Costa, and L. Mateus. 2009. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:6000-6010.

- Silvestre, F. T., T. S. Carvalho, P. C. Crawford, J. E. Santos, C. R. Staples, T. Jenkins, and W. W. Thatcher. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *J. Dairy Sci.* 94:2285-2301.
- So, M. and B. J. McCarthy. 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:4011-4015.
- Srinivasan, U., B. Foxman, and C. F. Marrs. 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 41:285-289.
- Toth, I., F. Herault, L. Beutin, and E. Oswald. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285-4291.
- Urton, G., M. A. G. von Keyserlingk, and D. M. Weary. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 88:2843-2849.
- Werner, A., V. Suthar, J. Plontzke, and W. Heuwieser. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J. Dairy Sci.* 95:7105-7114.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. E. Noakes, G. C. W. England, A. Rycroft, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68:549-559.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, G. C. W. England, D. E. Noakes, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63:102-117.
- Woodward, M. J., P. J. Carroll, and C. Wray. 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31:251-261.

Table I: Summary of primer sets used in uniplex PCR for implication of probes of the 40 virulence genes tested in this study

Genes	Primer sequence :	length (bp)	Control strain	Reference
<i>CS31a</i>	for: GCACAATTACTGCTGATGCG	710	31a	Girardeau, 1991
	rev: GTTATAAGTTACTGCCACGTTTC	710	31a	Girardeau, 1991
<i>eaе</i>	for 5' CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT	791	ECL6611	Beaudry et al., 1996
	rev 5' ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA	791	ECL6611	Beaudry et al., 1996
<i>fl7</i>	for: TATCCTTGGAATACTGGCGG	300	S5/ECL13455	Cid, 1999
	rev: CCAGTGGTGTAAATCCGTGTT	300	S5/ECL13455	Cid, 1999
<i>faeG</i> (F4)	for 5' ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC	601	ECL7805	Ojeniyi., 1994
	rev 5' AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA	601	ECL7805	Ojeniyi., 1994
<i>fanC</i> (F5)	for 5' TGC GAC TAC CAA TGC TTC TG	450	B44s /ECL13316	Ojeniyi., 1994
	rev 5' TAT CCA CCA TTA GAC GGA GC	450	B44s /ECL13316	Ojeniyi., 1994
<i>afa8</i>	for: GTTGAAGTCTTAATACCAGTG	354	B94-791-177	Lalioui L. et al., 1999
	rev: TGAGCATTCTCCGCTAACTGATAAT	354	B94-791-177	Lalioui L. et al., 1999
<i>eltA</i> (LT)	for 5' TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA	275	ECL7805	Furrer, 1990
	rev 5' GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC	275	ECL7805	Furrer, 1990
<i>estI</i> (sta)	for 5' TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA CTG	163	ECL7805	So, 1980
	rev 5' GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT	163	ECL7805	So, 1980
<i>estII</i> (STb)	for 5' GCA ATA AGG TTG AGG TGA T	368	ECL7805	Lortie, 1991
	rev 5' GCC TGC AGT GAG AAA TGG AC	368	ECL7805	Lortie, 1991
<i>stx1</i>	for 5' TTA GAC TTC TCG ACT GCA AAG	531	ECL6611	Woodward et al., 1992
	rev 5' TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG	531	ECL6611	Woodward et al., 1992
<i>stx2</i>	for 5' TTA TAT CTG CGC CGG GTC TG	327	ECL6611	Woodward et al., 1992
	rev 5' AGA CGA AGA TGG TCA AAA CG	327	ECL6611	Woodward et al., 1992
<i>east1</i>	for 5' TCG GAT GCC ATC AAC ACA GT	125	ECL7805	Chapman et al., 2006
	rev 5' GTC GCG AGT GAC GGC TTT GTA G	125	ECL7805	Chapman et al., 2006
<i>fimH</i>	for TGCAGAACGGATAAGCCGTGG			Chapman et al., 2006
	rev GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			Chapman et al., 2006

<i>papC</i>	for: TGATATCACGCAGTCAGTAGC	205	ECL13421	Ewers et al., 2007
	rev: CCGGCCATATTCACATAAC	205	ECL13421	Ewers et al., 2007
<i>sfa</i>	for: CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	410	B94-279-174 et	Johnson James, communication
	rev: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	B94-279-174 et	Johnson James, communication
<i>bmaE</i>	for: ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	507	ECL12344	Chapman et al., 2006
	rev: AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507	ECL12344	Chapman et al., 2006
<i>afa</i>	for: GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	594	ECL18162 (2H16)	Le Bouguenec, 1999
	rev: CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	594	ECL18162 (2H16)	Le Bouguenec, 1999
<i>aida</i>	for 5' ACA GTA TCA TAT GGA GCC A	585	2787/ECL1033	Ngeleka, 2003
	rev 5' TGT GCG CCA GAA CTA TTA	585	2787/ECL1033	Ngeleka, 2003
<i>paa</i>	for: ATGAGGAACATAATGGCAGG	360	ECL7805/ECL6611	An, 1999
	rev: TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	360	ECL7805/ECL6611	An, 1999
<i>ibeA</i>	for: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	ECL12312	Ewers et al., 2007
	rev: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	ECL12312	Ewers et al., 2007
<i>cdtB</i>	a1F: AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA	466	ECL9632	Toth, 2003
	a2R: AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	466	ECL9632	Toth, 2003
	s1F: GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	ECL9632	Toth, 2003
	s2R: GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG	466	ECL9632	Toth, 2003
<i>cnf-1as</i>	for: TTGCCGTCCACTCTCACCAGT	1111	J96	Oswald, 1994
	rev: GGGGGAAGTACAGAAGAATTA	1111	J96	Oswald, 1994
<i>cnf-2as</i>	for: GTCACAATAGACAATAATTTCCG	1240	S5	Oswald, 1994
	rev: TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC	1240	S5	Oswald, 1994
<i>evaC</i>	for: CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	ECL12364/ECL12292	Chapman et al., 2006
	rev: CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	ECL12364/ECL12292	Chapman et al., 2006
<i>hlyE</i>	for: GAAACCGCAGATGGAGCATT	543		Silva, 2009
	rev: CGCCCGCAGCAATAGAATAG	543		Silva, 2009
<i>tsh</i>	for: GGTGGTGCCTGGAGTGG	640	ECL17088	Chapman et al., 2006
	rev: AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	ECL17088	Chapman et al., 2006
<i>fyuA</i>	for: TGATTAACCCGCGACGGGAA	880	ECL8985	Chapman et al., 2006
	rev: GGCGGCGTGCGCTTCTCGCA		ECL8985	Chapman et al., 2006

<i>sitA</i>	for: AGGGGGCACAACACTGATTCTCG	608	ECL1033	Rodriguez-Siek et al., 2005
	rev: TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	ECL1033	Rodriguez-Siek et al., 2005
<i>iutA</i>	for: GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300	ECL17088	Chapman et al., 2006
	rev: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	ECL17088	Chapman et al., 2006
<i>iucd</i>	for: AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA	778	ECL3110/ECL17088	Herrero, 1988
	rev: CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778	ECL3110/ECL17088	Herrero, 1988
<i>fepC</i>	for: TACCTGGATAATGCTGTCGG	347	EDL933	Chapman et al., 2006
	rev: ATGGTGTGATGGGGCTGGC	347	EDL933	Chapman et al., 2006
<i>iron</i>	for: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	ECL12421/ECL12021	Chapman et al., 2006
	rev: GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	ECL12421/ECL12021	Chapman et al., 2006
<i>irp1</i>	for: TGAATCGCGGGTGTCTTATGC	240	ECL12421	Karch et al., 1999
	rev: TCCCTCAATAAAGCCCACGCT	240	ECL12421	Karch et al., 1999
<i>irp2</i>	for: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	286	ECL12292/ECL12364	Ewers et al., 2007
	rev: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	286	ECL12292/ECL12364	Ewers et al., 2007
<i>kpsMTII</i>	for: GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	O1:K1	Chapman et al., 2006
	rev: CATCCAGACGATAAGCATGAGC	272	O1:K1	Chapman et al., 2006
<i>iss</i>	for: TCACATAGGATTCTGCCG		ECL1106	Chapman et al., 2006
	rev: AGAAATCAAAAGGTGGCC		ECL1106	Chapman et al., 2006
<i>malX</i>	for: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	922	ECL12021/ECL12312	Ewers et al., 2007
	rev: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	922	ECL12021/ECL12312	Ewers et al., 2007
<i>usp</i>	for: ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	ECL12021/ECL12312	Bauer et al., 2002
	rev: AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	440	ECL12021/ECL12312	Bauer et al., 2002
<i>hra</i>	for: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC	537	ECL1033	Ewers et al., 2007
	rev: GTAACTCACACTGCTGTCACCT	537	ECL1033	Ewers et al., 2007
<i>neuC</i>	for: GGTGGTACATTCCGGGATGTC	676	ECL12421	Ewers et al., 2007
	rev: AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	ECL12421	Ewers et al., 2007
<i>hlyA</i>	F: 5'ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165	EDL933	Fagan et al., 1999
	R: 5'CTTCACGTGACCATACATAT	165	EDL933	Fagan et al., 1999

Table II: Bacterial species isolated from uterus of Holstein dairy cows (in 6 farms) without postpartum metritis in the first week postpartum.

Farm	Cow (N)	Uterine sample positive for						
		<i>E. coli</i> (Mono) N (% by farm)	<i>T. p</i> (Mono) N (% by farm)	<i>F. n</i> (Mono) N (% by farm)	<i>E. coli</i> + <i>T. P</i> N (% by farm)	<i>E. coli</i> + <i>F. n</i> N (% by farm)	<i>E.c</i> + <i>T.p</i> + <i>F.n</i> N (% by farm)	<i>T.p</i> + <i>F.n</i> N (% by farm)
1	174	40 (23)	24 (13.7)	2 (1)	39 (22.4)	2 (1)	4 (2.2)	1 (0.5)
2	147	50 (34)	18 (12.2)	0	22 (15)	1(0.6)	2 (103)	1 (0.6)
3	135	39 (29)	14 (10.3)	0	33 (24.4)	0	1(2.5)	2(5.1)
4	11	3 (27)	1	0	0	0	0	0
5	11	6 (54.5)	0	0	4	0	0	0
6	8	4 (50)	1	0	2	0	0	0
Total	486	142 (29)	58 (12)	2(0.4)	100 (20.5)	3 (0.6)	7 (1.4)	4(0.8)

E. coli = *Escherichia coli*, *T. p* = *Trueperella pyogenes*, *F. n* = *Fusobacterium necrophorum*
Mono = Monoculture

Table III: Univariable association between the presence of bacterial species in the uterus of Holstein dairy cows in the 1st week postpartum and the development of postpartum metritis in the subsequent weeks.

Bacterial species	Metritis		
	n	prevalence (%)	<i>P</i>
Culture negative	165	8	Referent
<i>E. coli</i>	252	18	0.01
<i>T. pyogenes</i>	169	20	0.01
<i>E. coli</i> monoculture	142	14	0.90
<i>T. pyogenes</i> monoculture	58	7	0.14
<i>E. coli</i> + <i>T. pyogenes</i>	100	24	0.01

A different model was used for each bacterial species and “culture negative” used as referent

Table IV: Univariable association between the presence of *E. coli* carrying certain virulence genes in the uterus of postpartum Holstein dairy cows, in the 1st week postpartum, and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, in cows positive for intrauterine *E. coli*.

Virulence genes	Metritis		
	n	prevalence %	<i>P</i>
<i>E. coli</i> (+) and <i>iroN</i> absent	147	22	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>iroN</i> present	16	38	0.16
<i>E. coli</i> (+) and <i>hra1</i> absent	111	19	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>hra1</i> present	52	31	0.10
<i>E. coli</i> (+) and <i>f17</i> absent	156	22	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>f17</i> present	7	43	0.21
<i>E. coli</i> (+) and <i>kpsMTII</i> absent	149	22	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>kpsMTII</i> present	14	36	0.25

A different model was used for each virulence gene

Table V: Univariable association between the presence of *E. coli* carrying certain virulence genes in the uterus of postpartum Holstein dairy cows, in the 1st week postpartum, and the occurrence of postpartum metritis in the subsequent weeks, in cows positive and negative for intrauterine *E. coli*.

Virulence genes	n	Metritis	
		prevalence %	<i>P</i>
<i>E. coli</i> (-) and <i>iroN</i> (-)	470	13	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>iroN</i> (+)	16	38	<0.01
<i>E. coli</i> (-) and <i>hra1</i> (-)	434	12	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>hra1</i> (+)	52	31	<0.01
<i>E. coli</i> (-) and <i>fl7</i> (-)	479	13	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>fl7</i> (+)	7	43	0.02
<i>E. coli</i> (-) and <i>kpsMTII</i> (-)	472	13	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>kpsMTII</i> (+)	14	36	0.01
<i>E. coli</i> (-) and <i>fimH</i> (-)	342	12	Referent
<i>E. coli</i> (+) and <i>fimH</i> (+)	144	20	0.01

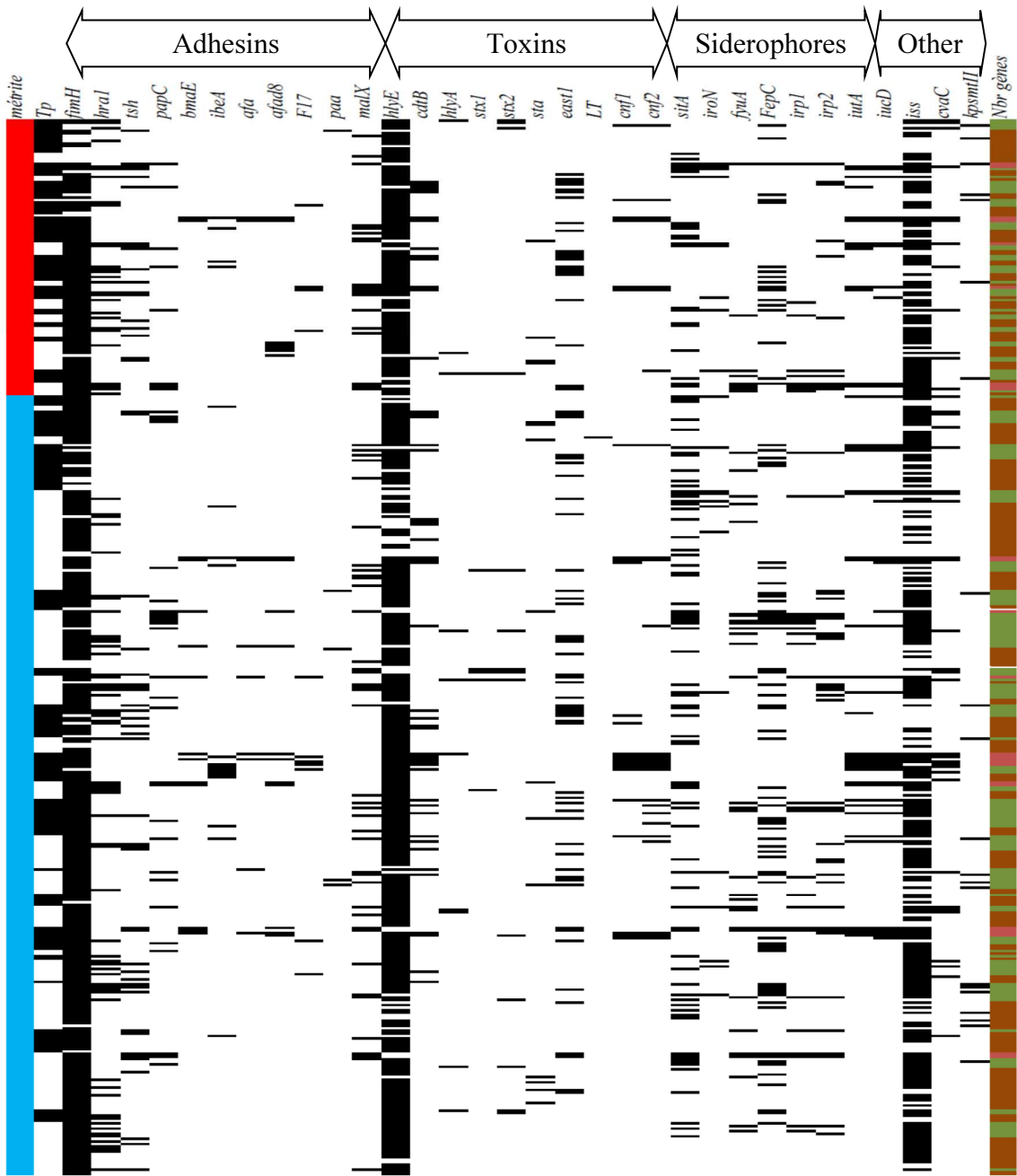
A different model was used for each virulence gene

Table VI: Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of using intrauterine *E. coli* and the genes *kpsMTII* and *hraI*, to predict postpartum metritis in Holstein dairy cows in the 1st week postpartum.

Virulence gene (VG)	n	Prevalence		Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)	P
		metritis (%)						
		VG Present	VG Absent					
<i>E. coli</i>	261	18	9	70	50	18	91	0.01
<i>hraI</i>	51	31	12	28	90	31	88	0.01
<i>kpsMTII</i>	14	36	13	9	97	36	86	0.03
<i>hraI</i> or <i>kpsMTII</i>	62	32	11	30	90	32	90	0.01

The combination *kpsMTII* and *hraI* was not found in the data

Figure 1: Distribution of the 32 virulence genes identified in intrauterine *E. coli* isolated from 163 Holstein dairy cows in the first week postpartum, in cows with postpartum metritis and cows without postpartum metritis.



■ Positive for metritis ■ Negative for metritis
 No of genes on 1 isolate: ■ 1 to 4 genes ■ 5 to 9 genes ■ 10 to 15 genes
 The virulence genes are grouped according to their function, and a black color means positive, white color means negative.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il a été démontré dans les études antérieures que *E. coli* et *T. pyogenes* sont des agents pathogènes fréquemment isolés de l'utérus des vaches laitière postpartum (Huszenicza et al., 1999; Sheldon and Dobson, 2004). Dans la présente étude, cette observation a été confirmée; les prévalences d'*E. coli* et de *T. pyogenes* ont été de 52% et 35%, respectivement. Ces prévalences sont plus élevées que dans les études précédentes: *E. coli* 25 à 33% et *T. pyogenes* 10% (Dohmen et al., 2000; Bicalho et al., 2010; Werner et al., 2012). Mais il faut noter que ces études avaient été effectuées dans différents pays et les prélèvements utérins avaient été faits à différentes périodes postpartum. Ceci pourrait expliquer les différences de prévalence dans les résultats, étant donné que la charge bactérienne de l'utérus peut varier en fonction de l'environnement et que cette charge bactérienne postpartum diminue avec le temps après le vêlage (Elliott et al., 1968; Földi et al., 2006; Werner et al., 2012).

En effectuant des analyses univariées qui ne tenaient pas compte des autres facteurs de risque de la métrite postpartum (troupeau, parité), nous avons trouvé que les vaches positives pour *T. pyogenes* seul ou *E. coli* seul ont montré une faible prévalence de la métrite postpartum tandis que chez les vaches positives pour ces 2 espèces bactériennes simultanément, la prévalence de la métrite postpartum était 2 à 3 fois plus élevée. L'association entre la métrite postpartum et la présence simultanée d'*E. coli* et *T. pyogenes* dans la présente étude pourrait se justifier par l'hypothèse selon laquelle *E. coli* et *T. pyogenes* agiraient en synergie pour induire les signes cliniques de la métrite postpartum (Huszenicza et al., 1999; Williams et al., 2005; Sheldon et al., 2010). Ainsi, on pourrait dire que la présence simultanée d'*E. coli* et *T. pyogenes* dans les prélèvements utérins pourrait permettre de prédire la métrite postpartum chez la vache laitière. Cependant, la métrite postpartum étant une maladie multifactorielle, de nombreux facteurs de risque liés à la gestion du troupeau, à la parité et à la santé des vaches pourraient également influencer son incidence (Urton et al., 2005; Huzzey et al., 2007; Dubuc et al., 2010).

En effectuant une analyse multivariée qui prenait en considération l'effet du troupeau et de la parité, nous avons trouvé que *E. coli* était la seule espèce bactérienne dont la présence dans l'utérus à la 1^{ère} semaine postpartum était associée au développement de la métrite

postpartum dans les semaines qui suivaient le prélèvement. Les vaches positives à *E. coli* (sans tenir compte si *E. coli* est seul ou en combinaison avec d'autres espèces bactériennes) avaient 2,6 fois plus de chance de développer la métrite postpartum comparativement aux vaches qui étaient négatives à toutes les espèces bactériennes. Ceci supporte les résultats de Werner et al. (2012) qui avaient rapporté que *E. coli* était associée au développement de la métrite postpartum. Ainsi, la présence d'*E. coli* dans les prélèvements utérins renseignerait sur les risques de développement de la métrite postpartum chez la vache laitière. Cependant, selon Azawi (2008) et Sheldon (2004), le développement de la métrite postpartum chez une vache ne dépendrait pas seulement de la présence des bactéries dans l'utérus, mais aussi de la capacité du système immunitaire de la vache à gérer cette infection. Le développement de la métrite postpartum dépendrait de l'interaction entre la défense immunitaire de l'utérus et la virulence des bactéries. Ainsi, la présence des gènes de virulence dans les bactéries jouerait également un rôle important dans le développement de la métrite postpartum.

Nos analyses univariées ont révélé une prévalence de la métrite postpartum significativement plus élevée chez les vaches positives à *E. coli* portant les gènes de virulence *fimH*, *f17*, *iroN*, *kpsMTII* ou *hral* que chez les vaches négatives à *E. coli*. Par contre, en procédant par une analyse multivariée qui prenait en considération l'effet du troupeau et de la parité, seulement deux gènes de virulence d'*E. coli*, *hral* et *kpaMTII*, ont été associés à la métrite postpartum dans le modèle final. Bien que les vaches positives à *fimH*, *iroN* ou *f17*, aient montré des prévalences de métrite postpartum significativement élevées dans les analyses univariées, ces gènes n'ont pas été associés à la métrite postpartum dans les analyses multivariées. Pour les gènes *iroN* et *f17*, cette absence d'association pourrait être due à un manque de puissance dans les analyses. Ce manque de puissance pourrait être causé par un nombre très réduit des vaches positives à *iroN* et *f17* (14/163 et 7/163 respectivement) dans cette étude. Concernant le gène *fimH*, l'absence d'association serait due au fait que la quasi-totalité des isolats d'*E. coli* (90%) possèdent le gène *fimH* (Langermann et al., 1997; Kapper et al., 2004). Dans la présente étude 88% des vaches à *E. coli* et dont les prélèvements ont été analysés ont été positives à *fimH*, ceci est en accord avec les résultats de Bicalho et al. (2010) et Sheldon et al. (2010), tandis que seulement 13% des vaches ont été positives à la métrite postpartum. Ainsi, la présence du gène *fimH* ne pourrait être un bon indicateur de la métrite

postpartum. Cependant, Bicalho et al. (2010) avait rapporté une association entre la présence de *fimH* et la métrite postpartum. Dans une autre étude du même auteur en 2011, la présence du gène *fimH* était associée à la métrite postpartum pour les prélèvements faits entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour postpartum; tandis que pour les prélèvements faits entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour postpartum la présence de *fimH* n'était pas associée à la métrite postpartum. Tout ceci suggèrerait que l'implication des gènes *fimH*, *iroN* et *fl7* dans le développement de la métrite postpartum reste encore à vérifier.

Le gène *kpsMTII* a été significativement associé à la métrite postpartum aussi bien dans les analyses univariées que multivariées, confirmant ainsi les résultats de Bicalho et al. (2010). Le gène *hral* a été testé pour la première fois dans notre étude et a été significativement associé à la métrite postpartum. Dans la présente étude, la présence des gènes *kpsMTII* et *hral* a permis de prédire correctement la métrite postpartum chez 36% et 31% des vaches, respectivement (valeur prédictive positive). Ainsi, la détection de chacun de ces deux gènes dans les prélèvements utérins pourrait permettre de prédire le risque de développement de la métrite postpartum dans les semaines qui suivent le prélèvement. Cependant, des efforts restent à faire pour améliorer la sensibilité du test.

Bien que *kpsMTII* et *hral* aient des fonctions différentes, ils contribueraient, chacun à leur manière, à la résistance des bactéries aux cellules du système immunitaire de l'utérus, permettant ainsi aux bactéries de persister dans l'utérus. Il est donc important de garder à l'esprit que la capacité de ces deux gènes de virulence à prédire la métrite postpartum pourrait varier en fonction du statut immunitaire de la vache. En effet, le développement de la métrite postpartum dépendrait aussi de la capacité des cellules immunitaires de l'utérus à éliminer les bactéries. Si la migration des cellules immunitaires (neutrophile) vers l'utérus s'effectue rapidement, et si le mécanisme de phagocytose n'est pas défectueux, la vache a de fortes chances de résister à la métrite postpartum (Gregory et al., 1997). Le système immunitaire joue donc un rôle très important dans la prévention des maladies en période péripartum (Wagter et al., 2003) et pourrait possiblement combattre le développement de la métrite postpartum malgré la présence des souches d'*E. coli* portant les gènes *hral* et *kpsMTII* dans l'utérus. L'influence du système immunitaire semble très importante si bien que dans une étude, Wagter (2000) avait évalué le statut immunitaire des vaches et les avait classées en 3 catégories ("High

immune response", "Average immune response" et "Low immune response"). Cet auteur avait observé que dans l'un des 3 troupeaux étudiés, la prévalence de cas de mammite chez les vaches de chaque catégorie était de 0%, 22% et 33% respectivement. Dans le cas de la métrite postpartum, une étude similaire n'a pas encore été effectuée. Il serait également intéressant de déterminer la prévalence de la métrite postpartum en fonction du statut immunitaire des vaches, et de déterminer l'association des gènes de virulence d'*E. coli* avec la métrite postpartum, en fonction du statut immunitaire de la vache.

Dans la présente étude, les *E. coli* isolés de l'utérus des vaches appartenaient majoritairement au groupe phylogénétique B1, suivi du groupe A et du groupe D. De plus, sur les 372 isolats analysés, seulement 7 appartenaient au groupe B2 (voir Annexe 1), confirmant les résultats de Wu et al. (2012) et de Sheldon et al. (2010). Dans notre étude, les *E. coli* du groupe B1 ont été les plus fréquemment isolés, aussi bien chez les vaches qui ont présenté les signes cliniques de la métrite postpartum que chez celles n'ayant pas développé la métrite postpartum, la prévalence étant plus élevée chez les vaches qui ont développé la métrite postpartum. Contrairement au groupe B1, la prévalence des isolats du groupe A a été plus élevée chez les vaches qui n'ont pas développé la métrite postpartum, tandis que les isolats du groupe D ont été équitablement répartis entre les vaches avec métrite postpartum et les vaches sans métrite postpartum. Les *E. coli* du groupe B2, bien que très peu nombreux ont été tous isolés des vaches qui ont développé la métrite postpartum, confirmant ainsi les résultats de Sheldon et al. (2010) qui, en plus avait observé que chez les vaches avec métrite postpartum, les groupes A et B1 étaient majoritaires tandis que chez les vaches sans métrite postpartum les groupes A, B1 et D étaient à proportion égale. Selon les études précédentes, la connaissance du groupe phylogénétique d'une souche d'*E. coli* pourrait renseigner sur sa pathogénicité potentielle. Par exemple chez l'humain, les EHEC, ETEC et STEC appartiennent exclusivement aux groupes A, B1, C et E tandis que les *E. coli* isolés du vagin et des infections urinaires appartiennent majoritairement au groupe B2 (Escobar-Páramo, 2004; Usein, 2011). Selon les mêmes auteurs, les *E. coli* du groupe B2 possèdent un grand nombre de gènes de virulence et par conséquent seraient les plus pathogènes. Dans la présente étude, nous n'avons pas mesuré d'association entre les gènes de virulence et les groupes phylogénétiques car seulement un sous-groupe des isolats a été testé pour les groupes phylogénétiques. Dans les

études ultérieures on pourrait déterminer si les gènes de virulence qui ont été associés à la métrite postpartum dans cette étude (*kpsMTII*, *hraI*) se retrouvent dans les isolats d'*E. coli* appartenant à certains groupes phylogénétiques particuliers. Nous n'avons pas observé d'association entre un groupe phylogénétique et la métrite postpartum. Cette absence d'association serait attribuable à un manque de puissance dans les analyses car les échantillons de seulement 87 vaches ont été analysés pour les groupes phylogénétiques. Néanmoins, la prédominance du groupe B1 et la présence exclusive du groupe B2 chez les vaches qui ont développé la métrite postpartum par la suite pourraient suggérer une implication des *E. coli* des groupes B1 et B2 dans le développement de cette infection dans certaines conditions. Il serait intéressant d'y accorder une attention particulière dans les études ultérieures.

Contrairement aux études similaires antérieures qui ont utilisé la technique de PCR pour identifier les gènes de virulence d'*E. coli*, dans la présente étude, nous avons utilisé la technique d'hybridation sur colonie des sondes radioactives. Compte tenu du nombre élevé de gènes et des isolats à tester dans cette étude, la technique d'hybridation sur colonie a été la meilleure technique à utiliser, compte tenu de sa rapidité, et des coûts abordables.

Comparativement aux études précédentes, la présente étude se démarque par les points forts suivants: i) un grand nombre de gènes de virulence d'*E. coli* ont été testés, ii) un grand nombre de vache ont été testées, iii) l'étude a été réalisée dans 6 différentes fermes laitières, iv) cette étude a été la première à évaluer la sensibilité et la spécificité des gènes de virulence d'*E. coli* à prédire le développement de la métrite postpartum chez les vaches laitières. La finalité de la recherche étant de fournir des résultats fiables et applicables à grande échelle sur le terrain, les points forts de notre étude nous permettent de croire que nos conclusions sont applicables aux troupeaux laitiers de la région de St-Hyacinthe et du Québec.

Cependant, la limite de la présente étude est que nous n'avons pas pris en compte le statut immunitaire des vaches inclus dans l'étude. Comme nous l'avons expliqué plus haut, le statut immunitaire de la vache peut considérablement influencer le développement de la métrite postpartum chez les vaches laitières. Raison pour laquelle des études ultérieures devraient évaluer le statut immunitaire des vaches en période postpartum (la capacité de la vache à libérer rapidement les cellules neutrophiles viables et fonctionnelles dans l'utérus après la

contamination bactérienne de l'utérus) et déterminer l'association entre la contamination bactérienne de l'utérus et le développement de la métrite postpartum en fonction du statut immunitaire de l'utérus de la vache postpartum.

CONCLUSION DU MÉMOIRE

La présence de la bactérie *E. coli* dans l'utérus de vache dans la 1^{ère} semaine postpartum a été associée à la métrite postpartum dans les semaines qui ont suivi. En outre, plusieurs gènes de virulence d'*E. coli* associés avec la métrite postpartum, dont *kpsMTII* et *hral*, ont été identifiés sur la bactérie *E. coli* d'origine utérine. De façon surprenante, certains gènes de virulence d'*E. coli* qui ont été rapporté être associés à la métrite postpartum dans certaines études précédentes n'ont pas été identifiés dans notre étude. Néanmoins, la présence de certains gènes de virulence pourrait fournir des renseignements qui permettraient de prédire le niveau de risque de développement de la métrite postpartum chez la vache laitière et permettre à l'éleveur d'anticiper des mesures préventives chez les vaches positives pour ces gènes. Cependant, puisque les gènes *kpsMTII* et *hral* permettent à *E. coli* de résister au système immunitaire de l'utérus, il est important de garder à l'esprit que la capacité de ces gènes à prédire la métrite postpartum pourrait varier d'un animal à l'autre, d'une ferme à l'autre, en fonction du statut immunitaire des animaux. Cette situation offre plusieurs champs de recherche qui pourraient évaluer, dans un troupeau, la capacité du système immunitaire des vaches à éliminer les bactéries qui colonisent l'utérus en période postpartum, les classer en fonction de leur statut immunitaire, déterminer si il existe une association entre le statut immunitaire et le développement de la métrite postpartum, et déterminer la capacité des gènes de virulence d'*E. coli* à prédire la métrite postpartum en fonction du statut immunitaire de la vache. La connaissance précise du statut immunitaire de la vache et des gènes de virulence d'*E. coli* présent dans les prélèvements utérins pourrait permettre de prédire la métrite postpartum avec plus de précision et de développer des tests de dépistage plus sensible à la ferme.

BIBLIOGRAPHIE

- Amabile de Campos, T., E. G. Stehling, A. Ferreira, A. F. Pestana de Castro, M. Brocchi, and W. Dias da Silveira. 2005. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 106:275-285.
- Andriamanga, S., J. Steffan, and M. Thibier. 1984. Metritis in dairy herds : An epidemiological approach with special reference to ovarian cyclicity. *Ann. Rech. Vet.* 15:503-508.
- Azawi, O. I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 105:187-208.
- Benzaquen, M. E., C. A. Risco, L. F. Archbald, P. Melendez, M. J. Thatcher, and W. W. Thatcher. 2007. Rectal Temperature, Calving-Related Factors, and the Incidence of Puerperal Metritis in Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:2804-2814.
- Bhargava, S., B. B. Johnson, J. Hwang, T. A. Harris, A. S. George, A. Muir, J. Dorff, and I. N. Okeke. 2009. Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. *J. Bacteriol.* 19:4934-4942.
- Bicalho, M. L. S., V. S. Machado, G. Oikonomou, R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet. Microbiol.* 157:125-131.
- Bicalho, R. C., V. S. Machado, M. L. S. Bicalho, R. O. Gilbert, A. G. V. Teixeira, L. S. Caixeta, and R. V. V. Pereira. 2010. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 93:5818-5830.
- Blomfield, I. C. 2001. The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* 45:1-49.
- Blum, G., V. Falbo, A. Caprioli, and J. Hacker. 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α -hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* 126:189-195.
- Bondurant, R. H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77:101-110.
- Bruun, J., A. K. Ersbøll, and L. Alban. 2002. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 54:179-190.

- Carbonetti, N. H., S. Boonchai, S. H. Parry, V. Vaisanen-Rhen, T. K. Korhonen, and P. H. Williams. 1986. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect. Immun.* 51:966-968.
- Caza, M., F. Lepine, S. Milot, and C. M. Dozois. 2008. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect. Immun.* 76:3539-3549.
- Chaffaux, S., H. Lakdissi, and M. Thibier. 1991. Etude épidémiologique et clinique des endométrites post-puerpérales chez les vaches laitières. *Rec. Méd. Vét.* 167:349-358.
- Chapman, T. A., X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson, and J. J. Chin. 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4782-4795.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4555-4558.
- Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:58-65.
- Clermont, O., M. Lescat, C. L. O'Brien, D. M. Gordon, O. Tenaillon, and E. Denamur. 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ. Microbiol. Rep.* 10:1000-1006.
- Dawson, K. G., J. C. Emerson, and J. L. Burns. 1999. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18:816-822.
- De Brito, B. G., L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* 71:4175-4177.
- Dho-Moulin, M. and J. M. Fairbrother. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316.
- Dobrindt, U., G. Blum-Oehler, G. Nagy, G. Schneider, A. Johann, G. Gottschalk, and J. Hacker. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I (536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* 70:6365-6372.

- Dohmen, M. J. W., K. Joop, A. Sturk, P. E. J. Bols, and J. A. C. M. Lohuis. 2000. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 54:1019-1032.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:5764-5771.
- Dziva, F. and M. P. Stevens. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian. Pathol.* 37:355-366.
- Elliott, L., K. J. McMahon, H. T. Gier, and G. B. Marion. 1968. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 29:77-81.
- Escobar-Páramo, P., O. Clermont, A.-B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguéneq, and E. Denamur. 2004. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21:1085-1094.
- Ewers, C., T. Janßen, S. Kießling, H.-C. Philipp, and L. H. Wieler. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104:91-101.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297:163-176.
- Fagan, R. P. and S. G. Smith. 2007. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* is an auto-aggregating adhesin and invasins. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:248-255.
- Fairbrother, J. M. 1993. Les colibacillooses du porc. *Ann. Méd.Vét.* 137:369-375.
- Földi, J., M. Kulcsar, A. Pecci, B. Huyghe, C. de Sa, J. A. Lohuis, P. Cox, and G. Huszenicza. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96:265-281.
- Foley, S. L., A. M. Lynne, and R. Nayak. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9:430-440.

- Foley, S. L., S. Simjee, J. Meng, D. G. White, P. F. McDermott, and S. Zhao. 2004. Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans. *J. Food Prot.* 67:651-657.
- Freter, R., H. Brickner, J. Fekete, M. M. Vickerman, and K. E. Carey. 1983. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect. Immun.* 39:686-703.
- Goshen, T. and N. Y. Shpigel. 2006. Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. *Theriogenology* 66:2210-2218.
- Gregory S, L. 1997. Uterine Health and Disorders. *J. Dairy Sci.* 80:984-994.
- Griffin, J. F., P. J. Hartigan, and W. R. Nunn. 1974a. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1:91-106.
- Griffin, J. F., P. J. Hartigan, and W. R. Nunn. 1974b. Non-specific uterine infection and bovine fertility. II. Infection patterns and endometritis before and after service. *Theriogenology* 1:107-114.
- Gröhn, Y., H. N. Erb, C. E. McCulloch, and H. S. Saloniemi. 1990. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Prev. Vet. Med.* 8:25-39.
- Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones, and H. L. Mobley. 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.* 70:4539-4546.
- Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne, and J. M. Fairbrother. 1991. Occurrence of pap, sfa, and afa related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* 66:177-182.
- Harman, J. L., G. Casella, and Y. T. Gröhn. 1996. The application of event-time regression techniques to the study of dairy cow interval-to-conception. *Prev. Vet. Med.* 26:263-274.
- Hendrickson, H. 2009. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS Genet.* 5:e1000335.
- Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6175-6181.

- Huszenicza, G., M. Fodor, M. Gacs, M. Kulcsar, M. J. W. Dohmen, M. Vamos, L. Porkolab, T. Kegl, J. Bartyik, J. Lohuis, S. Janosi, and G. Szita. 1999. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Rep. Dom. Anim.* 34:237-245.
- Huzzey, J. M., T. F. Duffield, S. J. LeBlanc, D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. G. von Keyserlingk. 2009. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 92:621-625.
- Huzzey, J. M., D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. G. von Keyserlingk. 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 90:3220-3233.
- Jann, K. and B. Jann. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J. Microbiol.* 38:705-710.
- Jaureguy, F., L. Landraud, V. Passet, L. Diancourt, E. Frapy, G. Guigon, E. Carbonnelle, O. Lortholary, O. Clermont, E. Denamur, B. Picard, X. Nassif, and S. Brisse. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9:560.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, T. T. O'Bryan, and J. N. Maslow. 2002. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185:1439-1447.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad E coli". *J. Lab. Clin. Med.* 139:155-162.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:383-404.
- Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188:745-758.
- Kaneene, J. B. and R. Miller. 1995. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Prev. Vet. Med.* 23:183-200.
- Kaper, J. B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:355-356.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.

- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet. J.* 176:102-114.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2223-2236.
- Mancini, J., B. Weckselblatt, Y. K. Chung, J. C. Durante, S. Andelman, J. Glaubman, J. D. Dorff, S. Bhargava, R. S. Lijek, K. P. Unger, and I. N. Okeke. 2011. The heat-resistant agglutinin family includes a novel adhesin from enteroaggregative *Escherichia coli* strain 60A. *J. Bacteriol.* 193:4813-4820.
- Markusfeld, O. 1987. Periparturient Traits in Seven High Dairy Herds. Incidence Rates, Association with Parity, and Interrelationships Among Traits. *J. Dairy Sci.* 70:158-166.
- Maroncle, N. M., K. E. Sivick, R. Brady, F. E. Stokes, and H. L. Mobley. 2006. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 74:6124-6134.
- Marrs, C. F., L. Zhang, and B. Foxman. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol. Lett.* 252:183-190.
- McPeake, S. J. W., J. A. Smyth, and H. J. Ball. 2005. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* 110:245-253.
- Mellata, M. 2013. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.*
- Mellata, M., K. Ameiss, H. Mo, and R. Curtiss, 3rd. 2010. Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* chi 7122 (O78:K80:H9). *Infect. Immun.* 78:1528-1541.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother. 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect. Immun.* 71:494-503.
- Mietzner, T. A. and S. A. Morse. 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* 14:471-493.

- Moreno, E., J. R. Johnson, T. Perez, G. Prats, M. A. Kuskowski, and A. Andreu. 2009. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes. Infect.* 11:274-280.
- Moreno, E., I. Planells, G. Prats, A. M. Planes, G. Moreno, and A. Andreu. 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53:93-99.
- Noakes, D. E., L. Wallace, and G. R. Smith. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet. Rec.* 128:440-442.
- Noamani, B. N., J. M. Fairbrother, and C. L. Gyles. 2003. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Vet. Microbiol.* 97:87-101.
- Ochman, H. and R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157:690-693.
- Orskov, F., I. Orskov, D. J. Evans, Jr., R. B. Sack, D. A. Sack, and T. Wadstrom. 1976. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.* 162:73-80.
- Overton, M. and J. Fetrow. 2008. Economics of postpartum uterine health. Dairy Cattle Reproduction Council Convention.
- Paisley, L. G., W. D. Mickelsen, and P. B. Anderson. 1986. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology* 25:353-381.
- Potter, T. J., J. Guitian, J. Fishwick, P. J. Gordon, and I. M. Sheldon. 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74:127-134.
- Russo, T. A., U. B. Carlino, and J. R. Johnson. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69:6209-6216.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181:1753-1754.

- Russo, T. A. and J. R. Johnson. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes. Infect.* 5:449-456.
- Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois. 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect. Immun.* 76:601-611.
- Sheldon, I. M. 2004. The postpartum uterus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:569-591.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, and H. J. Schuberth. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81:1025-1032.
- Sheldon, I. M. and H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:295-306.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, and R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516-1530.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. Rycroft, and H. Dobson. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.* 148:172-175.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, and H. Dobson. 2002a. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* 151:531-534.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, D. U. Pfeiffer, and H. Dobson. 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., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, M. H. Roberts, S. B. Price, R. O. Gilbert, and K. W. Simpson. 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.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. Miller, D. M. Nash, and S. Herath. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176:115-121.

- Shulman, S. T., H. C. Friedmann, and R. H. Sims. 2007. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* 45:1025-1029.
- Silva, E., S. Leitão, T. Tenreiro, C. Pomba, T. Nunes, L. Lopes da Costa, and L. Mateus. 2009. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:6000-6010.
- Silvestre, F. T., T. S. Carvalho, P. C. Crawford, J. E. Santos, C. R. Staples, T. Jenkins, and W. W. Thatcher. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *J. Dairy Sci.* 94:2285-2301.
- Sprenkel, C., Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. M. Raymond, S. M. Newton, and P. E. Klebba. 2000. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J. Bacteriol.* 182:5359-5364.
- Srinivasan, U., B. Foxman, and C. F. Marrs. 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 41:285-289.
- Steffan, J. 1987. Les métrites en élevage bovin laitier : quelques facteurs influençant leur fréquence et leurs conséquences sur la fertilité. *Rec. Méd. Vét* 163:183-188.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207-217.
- Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, E. Bingen, S. Bonacorsi, C. Bouchier, O. Bouvet, A. Calteau, H. Chiapello, O. Clermont, S. Cruveiller, A. Danchin, M. Diard, C. Dossat, M. E. Karoui, E. Frapy, L. Garry, J. M. Ghigo, A. M. Gilles, J. Johnson, C. Le Bouguenec, M. Lescat, S. Mangenot, V. Martinez-Jehanne, I. Matic, X. Nassif, S. Oztas, M. A. Petit, C. Pichon, Z. Rouy, C. S. Ruf, D. Schneider, J. Tourret, B. Vacherie, D. Vallenet, C. Medigue, E. P. Rocha, and E. Denamur. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5:e1000344.
- Urton, G., M. A. G. von Keyserlingk, and D. M. Weary. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 88:2843-2849.
- Usein, C.-R., L. A. Grigore, R. M. Georgescu, M. C. Băltoiu, M. Condei, and M. D. Teleman. 2011. Phylogenetic background and extraintestinal virulence genotypes of *Escherichia*

coli vaginal strains isolated from adult women. *Revista Română de Medicină de Laborator* 19:1-4.

- Wagter, L. C., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, K. E. Leslie, P. J. Boettcher, and J. C. Dekkers. 2003. The relationship between milk production and antibody response to ovalbumin during the peripartum period. *J. Dairy Sci.* 86:169-173.
- Wagter, L. C., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, K. E. Leslie, P. J. Boettcher, and J. C. M. Dekkers. 2000. A Quantitative Approach to Classifying Holstein Cows Based on Antibody Responsiveness and Its Relationship to Peripartum Mastitis Occurrence. *J. Dairy Sci.* 83:488-498.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Sonnenberg, and F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:17020-17024.
- Werner, A., V. Suthar, J. Plontzke, and W. Heuwieser. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J. Dairy Sci.* 95:7105-7114.
- Wiles, T. J., B. K. Dhakal, D. S. Eto, and M. A. Mulvey. 2008a. Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol. Biol. Cell* 19:1427-1438.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey. 2008b. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85:11-19.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. E. Noakes, G. C. W. England, A. Rycroft, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68:549-559.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, G. C. W. England, D. E. Noakes, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63:102-117.

- Williams, P. H. and N. H. Carbonetti. 1986. Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 51:942-947.
- Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown, J. R. Glisson, W. L. Steffens, and J. J. Maurer. 1998. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Dis.* 42:194-198.
- Wu, G., R. Ehricht, M. Mafura, M. Stokes, N. Smith, G. C. Pritchard, and M. J. Woodward. 2012. *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. *Vet. Microbiol.* 160:197-206.

Annexe 1:

Prévalence des groupes phylogénétiques chez le *E. coli* d'origine utérine

Un sous-échantillon de 372 isolats de *E. coli* ont été sélectionnés au hasard et classés dans les groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D par la méthode PCR triplex en identifiant les gènes *chuA*, *yjaA* et le fragment d'ADN TSPE4C2. Parmi les 372 isolats de *E. coli* testés, 192 isolats provenaient des 47 vaches positives à *E. coli* qui ont développé la métrite postpartum, et 180 isolats provenaient de 40 vaches négatives à la métrite postpartum. De tous les 372 isolats de *E. coli* testés, 18% (n = 66) appartenaient au groupe A, 66% (n = 247) appartenait au groupe B1, 14% (n = 53) au groupe D et seulement 2% (n = 7) au groupe B2. Les isolats de *E. coli* appartenant au groupe B1 étaient plus fréquemment isolés chez les vaches qui ont développé la métrite postpartum dans la 2^{ème} et 3^{ème} semaine postpartum. Tous les 7 isolats du groupe B2, bien que peu nombreux, provenaient des vaches qui ont présenté les signes cliniques de la métrite postpartum (Figure 5).

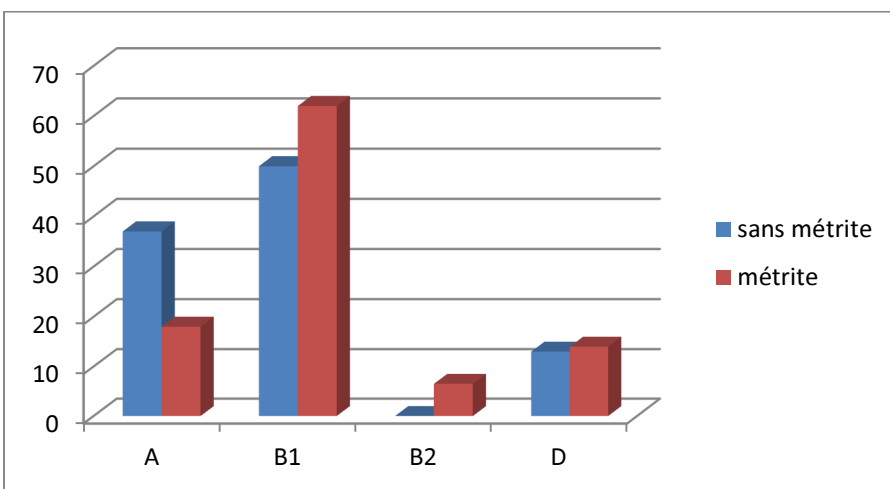


Figure 5: Distribution des groupes phylogénétiques de *E. coli* intra-utérin chez les vaches avec métrite et sans métrite postpartum.